

# **Vorkommen, Stabilität und enzymatische Derivatisierung von Flavonolen in Echtem und Tatarischem Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* M. und *Fagopyrum tataricum* G.)**

**Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

vorgelegt von  
**Ramin Kawiani**

**Kiel, 2009**

Referentin: Prof. Dr. Karin Schwarz

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Bilger

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juli 2009

Zum Druck genehmigt: 15. September 2009

gez. Prof. Dr. Lutz Kipp, Dekan

*„I like food, food is good!“*

Milo Aukerman (The Descendents)

---

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis		vi
Tabellenverzeichnis		x
Abkürzungsverzeichnis		xi
1	Einleitung	1
1.1	Theoretischer Hintergrund	2
1.1.1	Rutin, Isoquercitrin und Quercetin	2
1.1.2	Buchweizen	5
1.1.3	Rutin und Quercetin in Buchweizen	7
1.1.4	Prozessierung	10
1.1.5	Enzymatische Umsetzung von Rutin	12
1.2	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	17
2.1	Material	17
2.1.1	Buchweizenmaterial	17
2.1.2	Chemikalien	17
2.1.3	Enzyme	18
2.1.4	Häufig verwendete Lösungen	18
2.1.5	Organismen	19
2.1.6	Nährmedien	19
2.2	Allgemeine Methoden	20
2.2.1	Schälen der Samen des Tatarischen Buchweizens Lifago	20
2.2.2	Mahlen von Buchweizensamen	20
2.2.3	Trockensubstanzgehalt	20

---

2.2.4	Buchweizenprobenvorbereitung	20
2.2.5	Bestimmung von Rutin, Quercetin und Isoquercitrin mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	21
2.2.6	HPLC-Standardkalibrierungen	22
2.2.6.1	Rutin	22
2.2.6.2	Quercetin	23
2.2.6.3	Isoquercitrin	23
2.2.7	Massenspektrometrie mit Elektrosprayionisierung	23
2.2.8	Stabilität von Rutin und Quercetin in Buchweizenteig	24
2.2.8.1	Beobachtung des Rutingehalts während der Quellung	25
2.2.8.2	Viskosität des Teigs	25
2.2.9	Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase	25
2.2.9.1	Nasschemische Methoden	25
2.2.9.2	Inaktivierung durch Mikrowellenbehandlung	26
2.2.9.3	Inaktivierung durch Hitzebehandlung	26
2.3	Mikrobiologische Methoden	26
2.3.1	Anzuchtsbedingungen	26
2.3.2	Optische Dichte	27
2.3.3	Zellwachstumsversuche	27
2.3.4	Beobachtung des Einflusses von Ethanol auf das Zellwachstum	27
2.3.5	Fermentation von Rutin mit <i>Lb. plantarum</i> - und <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen	28
2.3.6	Gewinnung von Enzymextrakten durch Zellaufschluss	28
2.3.7	Testsystem zum Nachweis von Rhamnosidaseaktivitäten der Enzymextrakte von <i>Lb. plantarum</i> - und <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen	29

---

2.3.8	Hydrolyse von Rutin mit Enzymextrakten von <i>Lb. plantarum</i> - und <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen	30
2.3.9	Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase	31
2.3.10	Behandlung von Buchweizenmehl mit Hesperidinase	31
2.4	Statistische Methoden	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Rutin und Quercetin in Buchweizen	33
3.1.1	Rutin und Quercetin in Buchweizensamen von Saatgut Anbietern	33
3.1.2	Rutin und Quercetin im Samenmaterial verschiedener Buchweizenarten und –sorten	34
3.1.3	Rutin und Quercetin im Blattmaterial verschiedener Buchweizenarten und –sorten	36
3.1.4	Rutin und Quercetin in Samen und Schale von Tatarischem Buchweizen der Sorte Lifago	42
3.2	Stabilität von Rutin und Quercetin im Modellbuchweizenteig gegenüber verschiedenen Temperaturen	43
3.2.1	Beobachtung des enzymatischen Abbaus von Rutin zu Quercetin während des Anteigens bzw. im wässrigen System	43
3.2.2	Rutin- und Quercetiningehalte im Mehl in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit	45
3.2.3	Rutin- und Quercetiningehalte im Mehl in Abhängigkeit vom Wassergehalt bei verschiedenen Temperaturen	47
3.3	Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase	49
3.3.1	Nasschemische Methoden	49
3.3.2	Inaktivierung durch Mikrowellenbehandlung	50
3.3.3	Inaktivierung durch Hitzebehandlung	51

---

3.3.3.1	Viskosität des Teigs	52
3.4	Ansatz zur biochemischen Überführung von Rutin in Isoquercitrin	53
3.4.1	Wachstumskurven	53
3.4.1.1	<i>Lb. plantarum</i>	53
3.4.1.2	<i>Lb. rhamnosus</i>	55
3.4.2	Einfluss von Ethanol auf das Zellwachstum	59
3.4.2.1	<i>Lb. plantarum</i>	60
3.4.2.2	<i>Lb. rhamnosus</i>	63
3.4.3	Fermentation von Rutin mit Stämmen von <i>Lb. plantarum</i> und <i>Lb. rhamnosus</i>	66
3.4.4	Nachweis von Rhamnosidaseaktivität in Zellaufschlüssen	67
3.4.5	Hydrolyse von Rutin mit Enzymextrakten aus <i>Lb. plantarum</i> -Stämmen	72
3.4.6	Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase	75
3.4.7	Behandlung von Buchweizenmehl mit Hesperidinase	78
4	Diskussion	82
4.1	Bewertung von Buchweizen hinsichtlich seiner Rutin- und Quercetingehalte	82
4.2	Behandlung von Modellbuchweizenteig	87
4.3	Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase	89
4.4	Biochemische Überführung von Rutin in Isoquercitrin	92
4.5	Ausblick	97
	Zusammenfassung	100
	Summary	101
	Literaturverzeichnis	102

Anhang	112
Danksagung	119
Eidesstattliche Erklärung	120



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel(n).....	3
Abb. 2: Buchweizen; Lifago, Lindhof 2006 .....	6
Abb. 3: Reaktionsschema .....	15
Abb. 4: Arbeitsfließschema mit aufeinander aufbauenden Teilzielen unter Berücksichtigung der Arbeitshypothesen im Hinblick auf einen Beitrag zur Formulierung eines funktionellen Lebensmittels aus Buchweizen .....	16
Abb. 5: Vergleich der Rutinglehalte von Buchweizensamen verschiedener Sorten von Saatgut anbietern .....	33
Abb. 6: HPLC-Chromatogramm vom Extrakt von Buchweizensamen der Sorte Lifago .....	34
Abb. 7: Rutinglehalte in mg/kg TS in Buchweizensamen verschiedener Sorten aus Freilandversuchen .....	35
Abb. 8: HPLC-Chromatogramm vom Extrakt von Buchweizenblättern der Sorte Lifago .....	36
Abb. 9: Rutinglehalte in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten zu verschiedenen Erntezeitpunkten.....	37
Abb. 10: Einfluss des Erntezeitpunkts auf den mittleren Rutinglehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig von der Düngung), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse .....	38
Abb. 11: Einfluss der Stickstoffdüngung auf den mittleren Rutinglehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig vom Erntezeitpunkt), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse .....	39
Abb. 12: Quercetingehalte in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten zu verschiedenen Erntezeitpunkten.....	40
Abb. 13: Einfluss des Erntezeitpunkts auf den mittleren Quercetingehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig von der Düngung), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse .....	41

---

Abb. 14: Einfluss der Stickstoffdüngung auf den mittleren Quercetingehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig vom Erntezeitpunkt), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse .....	42
Abb. 15: Beobachtung der Rutin- und Quercetingehalte in mmol/kg in Buchweizenteig.....	44
Abb. 16: Einfluss der Behandlungsdauer im Konvektomat bei 150, 200 und 250 °C auf den Quercetingehalt in mg/kg im verbackenen Buchweizenteig .....	45
Abb. 17: Einfluss der Behandlungsdauer im Konvektomat bei 150, 200 und 250 °C auf den Rutingehalt in mg/kg im verbackenen Buchweizenteig .....	46
Abb. 18: Quercetingehalt in mg/kg Mehl in verbackenem Buchweizenteig in Abhängigkeit vom sinkenden Wassergehalt in % im Verlauf des Prozesses .....	47
Abb. 19: Rutingehalt in mg/kg Mehl in verbackenem Buchweizenteig in Abhängigkeit vom sinkenden Wassergehalt in % im Verlauf des Prozesses .....	48
Abb. 20: Nasschemische Versuche zur Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase .....	49
Abb. 21: Einfluss von Mikrowellenbehandlungen auf die F3g-Aktivität in Lifago-Mehl .....	50
Abb. 22: Einfluss zweier Hitzebehandlungen auf die F3g-Aktivität in Lifago-Mehl.....	51
Abb. 23: Wachstumskurven von <i>Lb. plantarum</i> 92260.....	53
Abb. 24: Wachstumskurven von <i>Lb. plantarum</i> 92265.....	54
Abb. 25: Wachstumskurven von <i>Lb. plantarum</i> K <sub>4</sub> Lb6 .....	54
Abb. 26: Wachstumskurven von <i>Lb. rhamnosus</i> 92255 .....	55
Abb. 27: Wachstumskurven von <i>Lb. rhamnosus</i> 92278.....	56
Abb. 28: Wachstumskurven von <i>Lb. rhamnosus</i> 92264.....	57
Abb. 29: Wachstumskurven von <i>Lb. rhamnosus</i> 92034.....	58
Abb. 30: Wachstumskurven von <i>Lb. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103) .....	58
Abb. 31: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. plantarum</i> 92260 .....	60

---

Abb. 32: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. plantarum</i> 92265 .....	61
Abb. 33: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. plantarum</i> K <sub>4</sub> Lb6 .....	61
Abb. 34: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. rhamnosus</i> 92255 .....	63
Abb. 35: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. rhamnosus</i> 92278 .....	63
Abb. 36: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. rhamnosus</i> 92264 .....	64
Abb. 37: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. rhamnosus</i> 92034 .....	64
Abb. 38: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von <i>Lb. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103) .....	65
Abb. 39: HPLC-Kontrolle nach Fermentation von Rutin mit <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen .....	66
Abb. 40: HPLC-Kontrolle nach Fermentation von Rutin mit <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen .....	67
Abb. 41: HPLC-Kontrolle nach Inkubation von Rutin mit Zellextrakten von <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen .....	70
Abb. 42: HPLC-Kontrolle nach Inkubation von Rutin mit Zellextrakten von <i>Lb. plantarum</i> -Stämmen .....	71
Abb. 43: HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze von Rutin mit Enzymextrakten aus <i>Lb. plantarum</i> K <sub>4</sub> Lb6 .....	73
Abb. 44: Relative Ausbeuten in % an Isoquercitrin und Quercetin nach Inkubation von Rutin mit Enzymextrakten aus <i>Lb. plantarum</i> -Stämmen .....	74
Abb. 45: HPLC-Chromatogramme der Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase .....	76
Abb. 46: Enzymatische Überführung von Rutin in Isoquercitrin durch Inkubation mit Hesperidinase .....	77

Abb. 47: HPLC-Chromatogramme der Inkubation von hitzebehandeltem Buchweizenmehl mit Hesperidinase .....	79
Abb. 48: Inkubation von Hesperidinase mit hitzebehandeltem Buchweizenmehl.....	80

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Physiologische Wirkungen von Quercetin bzw. Rutin.....	4
Tab. 2: Buchweizensystematik (nach Kuhlmann, 1998).....	5
Tab. 3: Rutingehalte im Samen des Echten Buchweizens.....	8
Tab. 4: Rutingehalte im Samen des Tatarischen Buchweizens .....	8
Tab. 5: Vergleich der Rutin- und Quercetiningehalte in mg/kg TS in Samen und Schale von Buchweizensamen der Sorte Lifago.....	43
Tab. 6: Viskosität von Lifago-Teig vor und nach Hitzebehandlung.....	52
Tab. 7: Spezifische Rhamnosidaseaktivität der groben Enzymextrakte von <i>Lb. rhamnosus</i> -Stämmen.....	68
Tab. 8: Spezifische Rhamnosidaseaktivität der groben Enzymextrakte von <i>Lb. plantarum</i> -Stämmen.....	69
Tab. 9: Sprosstrockenmasseerträge der Buchweizenernte 2007 .....	85
Tab. 10: Wassergehalte diverser Backwaren (Souci et. al., 2000).....	89
Tab. 11: Rohdaten der Gehaltsbestimmungen in Buchweizensamen mittels HPLC.....	112
Tab. 12: Rohdaten der Gehaltsbestimmungen in Buchweizenblättern von 2007 mittels HPLC.....	114
Tab. 13: Rohdaten der Gehaltsbestimmungen in Buchweizenblättern von 2008 mittels HPLC.....	116
Tab. 14: Massenspektrometrische Identifizierung von Rutin, Isoquercitrin und Quercetin in diversen Proben, deren Retentionszeiten zugeordnet.....	118

---

## Abkürzungsverzeichnis

DAD	Diodenarraydetector
DSV	Deutsche Saatveredelung
EC	Enzymkommission
ESI	Elektrosprayinterface
F3g	Flavonol-3-glucosidase
HPLC	High performance liquid chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
konz.	konzentriert
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie
rcf	Relative centrifugal force, Relative Zentrifugalbeschleunigung
RP	reversed phase
rpm	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
TS	Trockensubstanz
UV	ultravioletter Spektralbereich

## 1 Einleitung

Heute erlebt Buchweizen, in der westlichen Gesellschaft als „die vergessene Kulturpflanze“ bezeichnet, einen starken Bedeutungszuwachs (Zeller & Hsam, 2004). Dabei begann die Kultivierung in Mitteleuropa schon im 13. Jahrhundert. Es wird vermutet, nomadische Völker brachten den Buchweizen aus der zentralasiatischen Region in mitteleuropäische Gefilde. In Deutschland wurde Buchweizen im 17. und 18. Jahrhundert großflächig angebaut. Gegen Ende des 18. Jahrhunderts begann schließlich die Kartoffel den Buchweizen als Getreideersatzpflanze zu verdrängen (Aufhammer, 2000; Kuhlmann, 1998; Zeller & Hsam, 2004). Erst in neuerer Zeit erfreut sich Buchweizen im Zuge des Interesses an physiologisch funktionellen sowie diätetischen Lebensmitteln wachsender Beliebtheit (Christa & Soral-Smietana, 2008). Funktionelle Lebensmittel werden als zusätzlicher Beitrag zu einer gesunden und ausgewogenen Ernährung betrachtet (DGE, 2008). Sie zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an physiologisch wertvollen Inhaltsstoffen aus. Diätetische Lebensmittel werden für eine besondere Ernährung u.a. bei Verdauungs- oder Stoffwechselstörungen wie z.B. Zöliakie oder Diabetes eingesetzt (Meyer, 2009). Vor allem Diabetes mellitus ist eine Krankheit mit immens steigender Prävalenz. Die Folgekrankheiten wie Arteriosklerose und schließlich koronare Herzerkrankung stellen neben Krebs die häufigsten Krankheiten mit Todesfolge in Europa dar (WHO, 2008). Diese Arbeit behandelt Substanzen in Buchweizen, speziell die Flavonole Rutin und Quercetin, die aus pharmakologischer Sicht einem präventiven Zweck hinsichtlich oben genannter Erkrankungen dienlich sein können (siehe Tab. 1 in 1.1.1). Rutin ist zwar ebenfalls in einer Vielzahl anderer Pflanzen präsent, allerdings ist seine Anwesenheit in essbaren Pflanzenteilen relativ selten (Kreft et al., 2006). Somit stellen die Samen des Pseudogereides eine Besonderheit dar. Dieser Besonderheit soll in der vorliegenden Arbeit als Beitrag zur Formulierung von Lebensmitteln aus Buchweizen mit den funktionellen Eigenschaften von Rutin, Quercetin und insbesondere dem Derivat Isoquercitrin Rechnung getragen werden. Weiterhin soll hier eine Möglichkeit aufgezeigt werden, die physiologische Funktionalität zu verbessern, indem die Bioverfügbarkeit dieser Flavonole (siehe 1.1.1) in Buchweizensamen durch enzymatische Derivatisierung gesteigert wird (siehe 1.2). So könnten Produkte aus Tatarischem Buchweizenmehl, wie Backwaren, ohne weitere Zusätze, allein durch adäquate technologische Behandlung und lebensmittelrechtskonformer Teigbereitung mit Milchsäurebakterien formuliert werden.

## 1.1 Theoretischer Hintergrund

### 1.1.1 Rutin, Isoquercitrin und Quercetin

Flavonole<sup>\*</sup> bzw. Polyhydroxyflavone stellen eine vielfältige Substanzgruppe an vom Chroman<sup>†</sup> abgeleiteten Verbindungen dar (Beyer & Walter, 1991). Ferner kommen sie frei oder glykosidisch gebunden als Flavonoide vor (Harborne et al., 1975). Diese Gruppe wiederum beinhaltet weiterhin Glykoside von u.a. Flavanonen, Flavonen, Isoflavonen, Catechinen und Anthocyanen (Harborne & Mabry, 1988; Römpp, 1995). Als pflanzliche Sekundärmetabolite erfüllen diese Substanzen vielfältige Funktionen und dienen u.a. als Antibiotika, Blütenfarbstoffe und Schirmpigmente zum Schutz des Photosynthese-Apparats (Heldt, 2008). Sie sind daher in einer Vielzahl pflanzlicher Arten wiederzufinden (Herrmann, 1988; Hertog et al., 1992b).

Der häufigste und damit wichtigste Vertreter der Flavonole ist der gelbe Pflanzenfarbstoff Quercetin. Größere Mengen sind z.B. in Zwiebeln, Kamille, Weißdorn, und Hopfen enthalten (Römpp, 1995). Von Quercetin gibt es eine Vielfalt an Derivaten, darunter methylierte und auch glykosylierte Verbindungen (Harborne & Mabry, 1988). Zu letzteren zählen das Quercetin-3-*O*-glucosid Isoquercitrin sowie das Quercetin-3-*O*-rhamnoglucosid oder auch Quercetin-3-*O*-rutinosid genannte Rutin. Hohe Gehalte von Rutin findet man in Buchweizen, Lindenblüten, diversen Citrus-Arten, Johanniskraut, und gelben Stiefmütterchen (Römpp, 1995). Die Strukturen dieser drei Derivate sind in Abb. 1 vereinfacht anhand der Struktur von Rutin dargestellt.

---

<sup>\*</sup> lat. flavus = gelb

<sup>†</sup> griech. chroma = Farbe



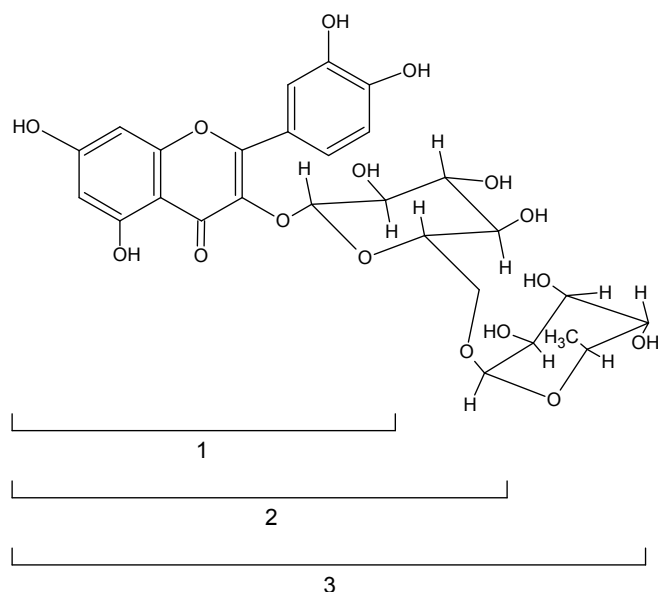


Abb. 1: Strukturformel(n)

1 Quercetin bzw. 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon, 2 Isoquercitrin bzw. 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon-3-O-β-D-glucopyranosid, 3 Rutin bzw. 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon-3-O-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid]

Die Biosynthese von Quercetin bzw. von Flavonoiden steht im engen Zusammenhang mit der Photosynthese und ist stark lichtabhängig (Mohr, 1969; Siegelmann, 1964; Siegelmann, 1969). Hierbei wird im Phenylpropanoid-Stoffwechsel gemäß Harborne & Mabry (1988) zunächst ein Chalkon als Zwischenstufe synthetisiert. Dessen C<sub>15</sub>-Gerüst wird aus einer Einheit 4-Coumaroyl-CoA und drei Einheiten Malonyl-CoA katalysiert durch die Chalkonsynthase aufgebaut. Das 4-Coumaroyl-CoA wird dafür in mehreren Schritten aus Phenylalanin synthetisiert. Phenylalanin ist ein Primärstoffwechselprodukt aus dem Shikimisäureweg. Malonyl-CoA auf der anderen Seite ist ebenfalls ein Primärmetabolit und entsteht durch Carboxylierung von Acetyl-CoA. Anschließend führen Kondensation und Hydroxylierungen zu den Flavonolen.

Rutin entsteht schließlich ebenfalls durch mehrere enzymatische Reaktionen. Zunächst katalysieren Enzyme die Übertragung der L-(+)-Rhamnose von Uridin-5'-diphosphat-β-L-Rhamnose auf Quercetin zu Isoquercitrin (Barber & Behrman, 1991). Aus Isoquercitrin und Uridin-5'-diphosphat-β-L-Rhamnose entstehen Rutin und Uridin, weshalb Isoquercitrin als Vorstufe von Rutin gesehen wird (Barber & Behrman, 1991). Neben seiner Funktion für die Pflanze wurden und werden noch heute Quercetin und seinen Derivaten umfangreiche humanphysiologische Wirkungen zugewiesen oder diese zumindest diskutiert. Werden diese

Eigenschaften pharmakologisch genutzt, können sie für den Menschen von großer Bedeutung sein. Die hier behandelten Flavonole können therapeutisch in der Pharmazie bzw. Medizin eingesetzt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit sie zu Präventionszwecken in der täglichen Nahrung verfügbar zu machen. Hierbei können sie als funktionelle Bestandteile Lebensmitteln zugesetzt oder durch entsprechende Lebensmittel mit hohen Gehalten dieser bioaktiven Verbindungen in ihrer natürlichen Matrix verzehrt werden. Literatur zu dieser Thematik sowie über bestätigte oder in Diskussion befindliche Wirkungen sind in Tab. 1 auszugsweise zusammengefasst.

Tab. 1: Physiologische Wirkungen von Quercetin bzw. Rutin

Physiologische Wirkung	Literatur
Antioxidativ	Jiang et al., 2007*; Guo et al., 2007; Hinneburg et al., 2006*; Schwarz et al., 2001; Watanabe et al., 1997*; Oomah & Mazza, 1996*
Antiarteriosklerotisch/ Risikominimierung für Koronare Herzerkrankung	Hertog et al., 1993a; Hertog et al., 1997
Antikarzinogen	Ahlenstiel et al., 2006; Hertog et al., 1992a; Hertog et al., 1993b; Williamson et al., 1996; Yang & Liu, 2009
Antiinflammatorisch	Rahman & Adcock, 2006; Afanas'ev et al., 2001
Immunsuppressiv/ Antiallergisch	Kaneko et al., 2008; Kim et al., 2003; Park et al., 2009*
Gefäßstabilisierend	Römpp, 1995
Gastroprotektiv	Kahraman et al., 2003; La Casa et al., 2000; Mojzis et al., 2001
Antithrombotisch	Hubbard et al., 2003; Watzl & Leitzmann, 1999
Hypoglykämisch/ Antidiabetisch	Kamalakkannan & Prince, 2006; Prince & Kamalakkannan, 2006

\* diese Veröffentlichungen stehen in direktem Zusammenhang mit Buchweizen

Ein wichtiger Faktor für die Pharmakokinetik von Flavonoiden ist deren Bioverfügbarkeit (Hu, 2007; Walle, 2004). In Tierversuchen hat sich gezeigt, dass die Resorption von Flavonolen abhängig von ihrer Struktur ist. So kann Rutin, also Quercetin-3-*O*-rhamnosylglucosid, erst im Dickdarm nach Hydrolyse des Disaccharidrests resorbiert werden (Bokkenheuser et al., 1987). Quercetin dagegen wird schon u.a. aufgrund seiner geringeren molekularen Größe und Polarität passiv in die Mucosazellen des Dünndarms und von dort aus weiter ins Plasma transportiert (Hollman, 2004). Dies zeigt sich durch eine höhere maximale Plasmakonzentra-

tion und ein schnelleres Auftreten der Metabolite im Plasma als nach Applikation von Rutin (Hollman, 2004). Allerdings ist hier wiederum die Resorption limitiert durch die geringe Löslichkeit aufgrund verstärkter Lipophilie (Lesser et al., 2006). Das Monoglucosid Isoquercitrin wird ebenfalls im Dünndarm resorbiert kann aber aktiv über Glucosetransporter durch die Membran der Mucosazellen transportiert werden (Wolffram et al., 2002). Isoquercitrin besitzt unter den drei Derivaten die höchste maximale Plasmakonzentration seiner Metabolite in Abhängigkeit von der Zeit zum Erreichen des Maximums im Plasma und somit die höchste Bioverfügbarkeit (Morand et al., 2000). Eine pharmakologische Nutzung oder der Einsatz in funktionellen Lebensmitteln würde also unter Umständen durch die Verfügbarkeit von Isoquercitrin anstelle der beiden oben vorwiegend behandelten Derivate aufgewertet werden.

### 1.1.2 Buchweizen

Der Name Buchweizen rührt von Farbe und Form der Samen, die stark an Bucheckern erinnern und vom Mehl, das fast so hell wie Weizenmehl ist (Zeller & Hsam, 2004). Die Bezeichnung ist allerdings irreführend, da es sich bei dieser Pflanze nicht um Getreide, also Zuchtformen von Süßgräsern (Poaceae), sondern um ein Knöterichgewächs handelt (Zeller & Hsam, 2004). Die botanische Systematik dieses Pseudogetreides gibt Tab. 2 wieder.

Tab. 2: Buchweizensystematik (nach Kuhlmann, 1998)

Klasse	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (Rosopsida)
Ordnung	Knöterichartige (Polygonales)
Familie	Knöterichgewächse (Polygonaceae)
Gattung	Buchweizen ( <i>Fagopyrum</i> )

Zur Gattung *Fagopyrum* zählen u.a. zwei Buchweizenarten, die in Europa größere Bedeutung gewonnen haben: Echter oder auch Gemeiner Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench) und Tatarischer Buchweizen (*Fagopyrum tataricum* Gaertner) (Kuhlmann, 1998).

Buchweizen (siehe Abb. 2) ist eine einjährige Pflanze mit einer Wuchshöhe von 40 bis 80 cm. Die Blütenfarbe variiert von weiß bis rot, während die scharfkantigen Samen im reifen Zustand eine braune bis schwarze Farbe aufweisen. Diese dreikantigen Samen sind 3 bis 4 mm breit und 5 bis 8 mm lang und botanisch gesehen Nüsse (Aufhammer, 2000; Kuhlmann, 1998;

Theurer, 1998). Sie haben einen hohen Stärkeanteil von 60 bis 70 %, wobei davon etwa 25 % auf Amylose und 75 % auf Amylopektin zurückgehen (Theurer, 1998; Zeller & Hsam, 2004). Das Fett ist größtenteils im Keimling angereichert. Der Fettgehalt liegt zwischen 2 bis 3 %. Das Buchweizenprotein zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren und eine besonders hohe biologische Wertigkeit aus. Der Proteingehalt der Buchweizensamen entspricht mit etwa 13 bis 15 % dem der Getreidesamen (Zeller & Hsam, 2004). Auch die Vitamin- und Mineralstoffgehalte sind mit den Gehalten von Getreidesamen vergleichbar (Römpp, 1995). Neben diesen Inhaltsstoffen enthalten die Buchweizensamen rund 13 % Wasser (Souci et al., 2000).



Abb. 2: Buchweizen; Lifago, Lindhof 2006

Infolge der ernährungsphysiologisch wertvollen Zusammensetzung der Buchweizensamen werden diese als Getreideersatz in Nahrungsmitteln verwendet. Da sie kein Gluten enthalten sind sie auch als entsprechend diätetische Lebensmittel bei Zöliakie bzw. Sprue geeignet (Defrancisci et al., 1994; Kuhlmann, 1998; Zeller & Hsam, 2004). Zudem senkt Konzentrat aus Buchweizensamen in Tierversuchen den Serumglucosespiegel, weshalb Buchweizenkonzentrat zur Behandlung von Diabetes nützlich sein könnte (Kawa et al., 2003). Diese beobachtete hypoglykämische Wirkung wird mit D-*chiro*-Inositol in Verbindung gebracht, das in großen Mengen im Buchweizensamenextrakt vorliegt (Kawa et al., 2003). Die beiden Arten Tatarischer und Echter Buchweizen werden allerdings nicht gleichermaßen verzehrt. Tatari-

scher Buchweizen wird trotz seiner höheren Rutin- und Flavonoidgehalte (siehe unten) und der doppelt so hohen Samenerträge selten verwendet. Der Grund hierfür ist der wesentlich stärkere Bittergeschmack der Produkte aus Tatarischem Buchweizen, die daher häufig abgelehnt werden (Suzuki et al., 2004; Zeller & Hsam, 2004). Der Bittergeschmack wird unter anderem von Rutin und Quercetin verursacht (Fabjan et al., 2003). Hier üben Flavonol-3-Glykosidasen auf den Abbau dieser Verbindungen und somit auf den bitteren Geschmack einen positiven, entbitternden Einfluss (Suzuki et al., 2004). Andere nicht-enzymatische Faktoren wie Tannine scheinen hingegen nur geringfügig zum Bittergeschmack beizutragen (Suzuki et al., 2004).

Im Gegensatz zur Verwendung der Samen als Nahrungsmittel findet das Buchweizenkraut mit Blüten und Blättern aufgrund seines hohen Gehalts an Rutin und anderen Flavonoiden pseudomedizinische Anwendung. Dazu wird es als Aufguss appliziert (Pahlow, 2000).

### 1.1.3 Rutin und Quercetin in Buchweizen

Der Gehalt an Rutin, dem in der Buchweizenpflanze und den Samen stark dominierenden Flavonoid (Kreft et al., 1999), ist abhängig von verschiedenen Faktoren. Viele Studien ergaben, dass sich der Rutingehalt in den Samen zwischen einzelnen Buchweizensorten unterscheidet (Kreft et al., 2006; Ohsawa & Tsutsumi, 1995; Qian et al., 1999; Steadman et al., 2001; Watanabe, 1998). Der Unterschied ließ sich auf die Menge oder die Aktivität von Enzymen, die an der Katalyse der Rutinbiosynthese beteiligt sind, während des Reifeprozesses zurückführen (Watanabe, 1998).

Wie zahlreiche Studien ergaben, sind die Rutingehalte im Samen zwischen den Buchweizenarten Tatarischer und Echter Buchweizen unterschiedlich. Die Tatarischen Buchweizensorten zeigten neben höheren Gesamtflavonoidgehalten (Jiang et al., 2007) und höheren antioxidativen Aktivitäten (Jiang et al., 2007) auch wesentlich höhere Rutingehalte als die Sorten des Echten Buchweizens (Aufhammer, 2000; Fabjan et al., 2003; Jiang et al., 2007; Kuhlmann, 1998; Steadman et al., 2001). Die in den unterschiedlichen Studien ermittelten Rutingehalte in den Samen von Echem und Tatarischem Buchweizen, weiterhin unterschieden hinsichtlich Mehl der geschälten Samen und Schale sind in Tab. 3 und Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 3: Rutingehalte im Samen des Echten Buchweizens

<b>Material</b>	<b>Rutingehalt</b>	<b>Literatur</b>
Samen	0,2 mg/kg TS	Quettier-Deleu et al., 2000
	0,2 – 1,7 mg/kg	Kreft et al., 1999
	1,0 mg/kg TS	Fabjan et al., 2003
	1,7 – 2,5 mg/kg	Jiang et al., 2007
	1,8 – 0,2 mg/kg TS	Steadman et al., 2001
	4,7 mg/kg	Oomah & Mazza, 1996
Schale	0,3 mg/kg	Kreft et al., 1999
	0,5 mg/kg TS	Quettier-Deleu et al., 2000
	7,7 mg/kg	Oomah & Mazza, 1996
	8,4 – 44,1 mg/kg TS	Steadman et al., 2001

Tab. 4: Rutingehalte im Samen des Tatarischen Buchweizens

<b>Material</b>	<b>Rutingehalt</b>	<b>Literatur</b>
Samen	81 – 166 mg/kg TS	Fabjan et al., 2003
	157 – 180 mg/kg	Jiang et al., 2007
	809 mg/kg TS	Steadman et al., 2001
Schale	44 mg/kg TS	Steadman et al., 2001

Wie Tab. 3 und Tab. 4 zu entnehmen ist, sind die Rutingehalte des Mehls und der Schale von Echem Buchweizen mit 0,2 bis 44,1 mg/kg TS größtenteils deutlich geringer als die Rutingehalte in Mehl und Schale von Tatarischem Buchweizen mit 44 bis 809 mg/kg TS. Auffällig ist, dass beim Echten Buchweizen die höchsten Rutingehalte in der Schale zu finden sind, während der Tatarische Buchweizen hingegen im Mehl einen wesentlich höheren Rutingehalt als in der Schale aufweist.

Andere Teile der Buchweizenpflanze enthalten teilweise wesentlich höhere Rutingehalte als die Samen. Laut Literatur wurden in Blüten, Stängeln und Blättern Rutingehalte von 3 bis 800 mg/kg ermittelt (Holasoova et al., 2002; Kalinova et al., 2006; Kreft et al., 2006; Kreft et al., 1999; Kreft et al., 2002; Pahlow, 2000). Durch den hohen Rutingehalt in Blüten, Stängeln

und Blättern gilt grünes Mehl, das durch Mahlen von trockenen blühenden Buchweizenpflanzen gewonnen wird, als gute Quelle für Rutin (Kreft et al., 1999).

Quercetin hingegen wurde in verschiedenen Studien nicht oder nur in geringen Mengen in Buchweizenpflanzen und -samen gemessen. Die Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen, ob Quercetin in Samen von Echtem Buchweizen enthalten ist. Fabjan et al. (2003) und Qian et al. (1999) konnten kein Quercetin nachweisen. Dietrych-Szostak & Oleszek (1999) fanden im Samen ebenfalls kein Quercetin, allerdings in der Schale. Watanabe et al. (1997) konnten ebenfalls Quercetin in der Schale nachweisen und einen Gehalt von 0,3 mg/kg TS bestimmen. Quettier-Deleu et al. (2000) fanden hingegen sowohl im Mehl als auch in der Schale einen Quercetiningehalt von ca. 0,02 mg/kg TS bzw. 0,06 mg/kg TS. Steadman et al. (2001) ermittelten in allen untersuchten Mehlfraktionen Quercetin. In Samen von Tatarischem Buchweizen fanden Steadman et al. (2001) und Fabjan et al. (2003) in den jeweilig untersuchten Mehlfraktionen immer geringe Quercetiningehalte.

Der Rutiningehalt von Buchweizenpflanzen und -samen ist auch von sortentypischen Eigenschaften abhängig. Die Wuchsdauer und der Blühzeitpunkt der Pflanzen sind für den Rutiningehalt entscheidend (Ohsawa & Tsutsumi, 1995). Samen von Buchweizensorten mit langer Wachstumsperiode haben einen höheren Rutiningehalt, ebenso wie Samen von spätblühenden Sorten (Ohsawa & Tsutsumi, 1995). Weiterhin ist der Rutiningehalt des Samens vom Reifegrad abhängig. Der Gehalt steigt während der Reifung des Buchweizensamens stark an und bleibt im vollständig ausgereiften Samen hoch (Suzuki et al., 2002). Somit hat auch der Zeitpunkt der Aussaat und Ernte einen Einfluss auf den Rutiningehalt (Fabjan et al., 2003).

Weiterhin beeinflussen Wachstums- bzw. Umweltbedingungen den Rutiningehalt der Buchweizenpflanze und der Samen. Die Menge an Rutin ist unter anderem von der Bestrahlungsintensität abhängig, da die Rutinsynthese wiederum stark lichtabhängig ist (siehe 1.1.1). Daher unterliegt der Rutiningehalt tagesperiodischen Schwankungen (Römpp, 1995). Eine intensivere Sonnenbestrahlung bewirkt einen erhöhten Rutiningehalt im Mehl von Echtem Buchweizen (Kreft et al., 2002; Ohsawa & Tsutsumi, 1995). Eine sehr hohe Bestrahlungsintensität führt jedoch zu einer Rutinabnahme (Kreft et al., 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Rutiningehalt in Samen ebenso wie der Flavonoidgehalt von weiteren äußeren Faktoren, wie beispielsweise Temperatur, Bodenbeschaffenheit oder Feuchtigkeit bzw. Wachstumsort, Wachstumsjahreszeit und den Wechselwirkungen zwischen diesen Faktoren beeinflusst wird (Fabjan et al., 2003; Oomah & Mazza, 1996). Wobei der Wachstumsort den größten Einfluss

auf den Rutin- und Flavonoidgehalt der Samen, die Wachstumsjahreszeit hingegen den größten Einfluss auf den Rutin- und Flavonoidgehalt der Schale hat (Oomah & Mazza, 1996).

#### 1.1.4 Prozessierung

Verschiedene Arten der Prozessierung beeinflussen die Gehalte an Rutin bzw. Quercetin in Buchweizen. So übt eine Hitzebehandlung einen Einfluss auf die Flavonoidgehalte der Buchweizensamen. Allerdings gelten Flavonoide als relativ hitzestabil (Watzl & Leitzmann, 1999). Dietrych-Szostak & Oleszek (1999) beispielsweise konnten zeigen, dass eine Hitzebehandlung bei Temperaturen von 150 °C zum Ablösen der Schale vom Buchweizenkorn das Buchweizenschrot verändert. Manuell geschältes und kurz erhitztes Schrot war hell braun, während das länger erhitzte Schrot eine dunkel braune Farbe aufwies. Durch die Hitzebehandlung wurden auch Geschmack und Aroma beeinflusst. Weiterhin waren Veränderungen des Flavonoidgehalts zu verzeichnen. Die Abnahme des Gesamtflavonoidgehalts in geschälten Buchweizensamen betrug bei 150 °C rund 20 % im Vergleich zu manuell geschältem Schrot, bei anhaltender Temperaturbehandlung etwa 37 %. Dietrych-Szostak & Oleszek (1999) konnten allerdings nicht klären, welche Prozesse für die beobachtete Abnahme des Flavonoidgehalts verantwortlich waren. Sie vermuteten, dass die Flavonoide durch Hitze beschädigt und/oder dass Glykoside durch Dampf herausgelöst wurden. Allerdings wurden die Proben vor der Behandlung gefeuchtet, was ebenfalls einen Einfluss üben könnte (siehe unten). Kreft et al. (2006) konnten einen drastischen Abbau Rutins von rund 40 % nach Hitzebehandlung des Schrots schon bei 100 °C für 1 Stunde feststellen.

Eine Behandlung von Buchweizenmehl mit Wasser kann enzymatisch katalysierte Reaktionen initiieren, die den Rutingehalt beeinflussen. Bei Anwesenheit von Wasser hydrolysieren Flavonol-3-glucosidasen die 3-*O*-Glucoside von Flavonolen (Suzuki et al., 2002). Die Rutin-3-glucosidase, eine Art  $\beta$ -D-Glucosidase, ist eine dieser Glucosidasen. Sie hydrolysiert Rutin unter Entstehung von Quercetin (Suzuki et al., 2002). Die Rutin-3-glucosidase katalysiert jedoch nur eine solche Reaktion, gerät sie mit ihrem Substrat Rutin in Kontakt. Wie Suzuki et al. (2002) zeigten, befinden sich bei Tatarischem Buchweizen im reifen Samen die Rutin-3-glucosidase und das Rutin in unterschiedlichen Bereichen. Der größte Teil des Rutins ist dabei im Embryo, während nahezu die gesamte Flavonol-3-glucosidase in der Samenschale lokalisiert ist. Wird die Struktur des Samens jedoch beispielsweise durch Mahlen zerstört, können



Glucosidasen und Rutin zueinander gelangen. Die Hydrolyse des Rutins verläuft dann bei Wasserzugabe sehr plötzlich (Yasuda & Nakagawa, 1994). In Tatarischen Buchweizensamen ist die Aktivität der Flavonol-3-glucosidasen hoch (Suzuki et al., 2002) und reicht aus, um das Rutin im Mehl in sehr kurzer Zeit nach Wasserzugabe zu hydrolysieren (Suzuki et al., 2002; Yasuda & Nakagawa, 1994). In Samen von Echtem Buchweizen hingegen ist die Flavonol-3-glucosidase-Aktivität wesentlich schwächer (Yasuda & Nakagawa, 1994). Weiterhin ist die Aktivität der Rutin-3-glucosidase vom Reifegrad des Samens abhängig und steigt während der Reifung (Suzuki et al., 2002).

Für eine Inaktivierung der rutinabbauenden Enzyme im Buchweizenmehl gibt es in der Literatur nur wenige Hinweise. Suzuki et al. (2004) verwendeten eine 84%ige methanolische Lösung zum Stoppen der enzymatischen Reaktionen. Weiterhin konnten die Flavonol-3-glucosidasen in Tatarischem Buchweizenmehl durch Erhitzung des Mehles für 24 Stunden bei 85 °C größtenteils inaktiviert werden (Suzuki et al., 2004). Ein ähnliches Verhalten zeigten die beiden von Yasuda & Nakagawa (1994) in Samen von Tatarischem Buchweizen isolierten rutinabbauenden Enzyme. Beide Enzyme wurden durch Inkubation bei 80 °C für 30 Minuten bei pH 7 vollständig inaktiviert. Außerdem führten ein pH-Wert unter 3 und sowohl die Zugabe von Kupfersulfat als auch von Aluminiumtrichlorid zur Inaktivierung der beiden Enzyme. Weitere Charakteristika der von Suzuki et al. (2002) untersuchten Flavonol-3-glucosidasen, bestehend aus zwei sehr ähnlichen Isoenzymen, waren eine maximale Rutin- und Isoquercitrin-3-glucosidase-Aktivität bei pH 5 und 40 °C. Die von Yasuda & Nakagawa (1994) isolierten rutinabbauenden Enzyme hatten ebenfalls ein pH-Optimum von 5.

Wird Buchweizenschrot hydrothermal behandelt, bewirken nicht nur die Flavonol-3-glucosidasen, sondern auch die Erhitzung eine Abnahme des Rutingehalts. Zwei Beispiele für den Rutinabbau durch Flavonol-3-glucosidasen mit Wasser bei höherer Temperatur liefern Kreft et al. (2006). Zum einen wurde in vorgekochtem Schrot mit rund 9 mg/100 g TS deutlich weniger Rutin gefunden als in ungekochtem Schrot mit 23 mg/100 g TS. Zum anderen enthielten Nudeln (7,84 mg/100 g TS) wesentlich weniger Rutin als das Mehl aus dem sie hergestellt wurden (21,85 g/100 g TS). Als mögliche Ursache für den niedrigeren Rutingehalt nach dem Kochen wurde von Kreft et al. (2006) neben dem Abbau des Rutins auch eine Zusammenlagerung des Rutins mit anderen Molekülen diskutiert, wodurch die Löslichkeit Rutins im Extraktionsmittel nachlasse.

### 1.1.5 Enzymatische Umsetzung von Rutin

Neben dem in 1.1.4 aufgeführten Abbau von Rutin im Buchweizenmehl zum Aglykon durch die endogene Flavonol-3-glucosidase, gibt es auch einige wenige Hinweise für eine Umsetzung zum Monoglucosid Isoquercitrin. Diese Hydrolyse wird katalysiert durch  $\alpha$ -L-Rhamnosidasen, die von Bakterienzellen und Pilzen exprimiert werden können, jedoch überwiegend an der Reinsubstanz Rutin beobachtet wurden:

So wiesen Zverlov et al. (2000) eine intrazelluläre  $\alpha$ -L-Rhamnosidase in *Clostridium sterco-rarium* nach. Das isolierte Enzym zeigte entsprechende Aktivitäten bei den Substraten Hesperidin und Naringin unter Bildung der Monoglucoside (Zverlov et al., 2000). Miake et al. (2000) isolierten eine intrazelluläre  $\alpha$ -L-Rhamnosidase aus *Pseudomonas paucimobilis*. Es konnte  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität bei einer Reihe synthetischer  $\alpha$ -L-Rhamnoside sowie bei den Substraten Hesperidin, Naringin, Quercitrin und auch Rutin nachgewiesen werden (Miake et al., 2000). Vergleichbare Aktivitäten zeigte eine intrazelluläre  $\alpha$ -L-Rhamnosidase isoliert aus *Sphingomonas* sp. R1 (Hashimoto & Murata, 1998).

$\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität bei Enzymen aus *Aspergillus niger* ist schon länger bekannt. Sanchez et al. (1987) untersuchten Hesperidinase aus *Aspergillus niger* genauer auf die Fähigkeit, die in C7-Position des Flavons Hesperidin gebundene Rhamnosylglucose unter Bildung des Monoglucosids zu spalten. Puri & Kalra (2005) verwendeten Naringinase aus *Aspergillus niger* MTCC 1344 für Versuche zur Bittergeschmacksregulierung von Naringin. Das isolierte Enzym zeigte  $\alpha$ -L-Rhamnosidase- aber auch  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität. Folglich wurden die Substrate Naringin und Rutin über die Monoglucoside als Zwischenprodukte bis zum Aglykon umgesetzt. Eine  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität beim Substrat Hesperidin war hingegen nicht zu beobachten, vermutlich aufgrund von sterischen Effekten (Puri & Kalra, 2005). Ebenso verhielt sich eine  $\alpha$ -L-Rhamnosidase aus *Aspergillus terreus*, die von Interesse in der Weinherstellung sein könnte (Gallego et al., 2001). Auch in Enzymextrakten aus dem Pilz *Penicillium decumbens* konnte  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität nachgewiesen werden (Young et al., 1989).

Weiterhin für eine mögliche Prozessierung von Lebensmitteln relevante  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität ließ sich in hitzebehandelter Pektinase wiederum aus *Aspergillus niger* Sun et al. (2007) nachweisen. Bei dieser Studie wurde Rutin in Spargelwasser enzymatisch erfolgreich zu Isoquercitrin umgesetzt. Ferner zeigten Gonzalez-Barrio et al. (2004) eine Um-

setzung von flavonoidischen Rutinosiden zu Monoglucosiden in Holunderbeersaft, Grünem Tee und Orangensaft durch enzymatische Behandlung mit  $\alpha$ -L-Rhamnosidasen aus *Aspergillus aculeatus*.

## 1.2 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere aufeinander aufbauende Teilziele angestrebt. Die anbaubegleitende Analytik zunächst war eines dieser Ziele. Sie diente der grundlegenden optimalen Sortenwahl hinsichtlich hoher Rutin- und Quercetingehalte in Samen und auch Blättern von Buchweizen. Weiterhin wurden die Anbau- und Erntebedingungen bei der Kultivierung im schleswig-holsteinischen Raum ebenfalls unter Berücksichtigung hoher Rutin- und Quercetingehalte untersucht.

- Arbeitshypothese I. Durch die Auswahl einer geeigneten Buchweizenart und -sorte lassen sich optimale Rutin- und Quercetingehalte in den Samen und Blättern erzielen. Und der Rutin- bzw. Quercetingehalt lässt sich im Erntegut optimieren durch Kontrolle des Erntezeitpunkts und durch Stickstoffdüngung.

Die Sorten des Tatarischen Buchweizens besitzen höhere Rutin- und Quercetingehalte als Sorten des Echten Buchweizens. Eine Stickstoffdüngung führt üblicherweise zur Ertragsverbesserung und beeinflusst unter Umständen die Biosynthese von Rutin und Quercetin. Die Biosynthese ist wiederum abhängig von Menge und Aktivität der beteiligten Enzyme während des Reifeprozesses und auch von der Bestrahlungsintensität. (Siehe 1.1.3.)

Weiterhin diente die Untersuchung der Prozessierung des Teigs aus Buchweizensamen dem Ziel der Erhaltung bzw. Steigerung von Rutin und Quercetin im Modellsystem.

- Arbeitshypothese II. Rutin bzw. Quercetin in Buchweizenteig lässt sich durch Kontrolle der Parameter Temperatur und Zeit beim Backprozess weitestgehend erhalten.

Die Begründung liegt in der Beobachtung, dass Hitzebehandlungen sowie Behandlung von Buchweizenmehl mit Wasser einen Einfluss auf die Rutin- und Quercetingehalte üben (siehe 1.1.4).

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Erhöhung der Bioverfügbarkeit der Flavonole in Buchweizenmehl, woraus schließlich die letzte Hypothese folgt:

- Arbeitshypothese III. Der Abbau von Rutin, katalysiert durch die Flavonol-3-glucosidase im Buchweizenmehl, lässt sich unterbinden. Und Rutin kann durch  $\alpha$ -L-Rhamnosidasen kontrolliert zum 3-*O*-Glucosid Isoquercitrin umgesetzt werden.

Die im Tatarischen Buchweizen vorhandene Flavonol-3-glucosidase führt im Buchweizenmehl im wässrigen System zur Hydrolyse von Rutin unter Bildung von Quercetin (1.1.4). Die Notwendigkeit zur Deaktivierung der Flavonol-3-glucosidase bei der Strategie einer enzymatischen Derivatisierung von Rutin zu Isoquercitrin erläutert Abb. 3 (siehe unten).  $\alpha$ -L-Rhamnosidasen sind befähigt diese Umsetzung zum Monoglucosid zu katalysieren (siehe 1.1.5). Isoquercitrin zeigt eine höhere Bioverfügbarkeit als Rutin und Quercetin (Morand et al., 2000)(siehe 1.1.1) und würde somit durch seine Anwesenheit im Buchweizenmehl zu einer gesteigerten Funktionalität von Buchweizenbackwaren beitragen.

Das Schema in Abb. 4 (siehe unten) verdeutlicht die geplante Vorgehensweise zur Untersuchung der Arbeitshypothesen. An dieser Stelle wird detaillierter auf das Vorgehen bei dem Versuch der kontrollierten enzymatischen Derivatisierung eingegangen.

Zunächst sollte die Hydrolyse von Rutin zu Quercetin, katalysiert durch die endogene Flavonol-3-glucosidase unterbunden werden. Dafür musste eine geeignete Behandlung des Mehls zur Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase vor dem Anteigen gefunden werden. Waren die biochemischen Reaktionen im Buchweizenmehl auf der Stufe des Rutins angehalten, konnte eine kontrollierte Hydrolyse zum Produkt Isoquercitrin, katalysiert durch eine  $\alpha$ -L-Rhamnosidase erfolgen (siehe Abb. 3).

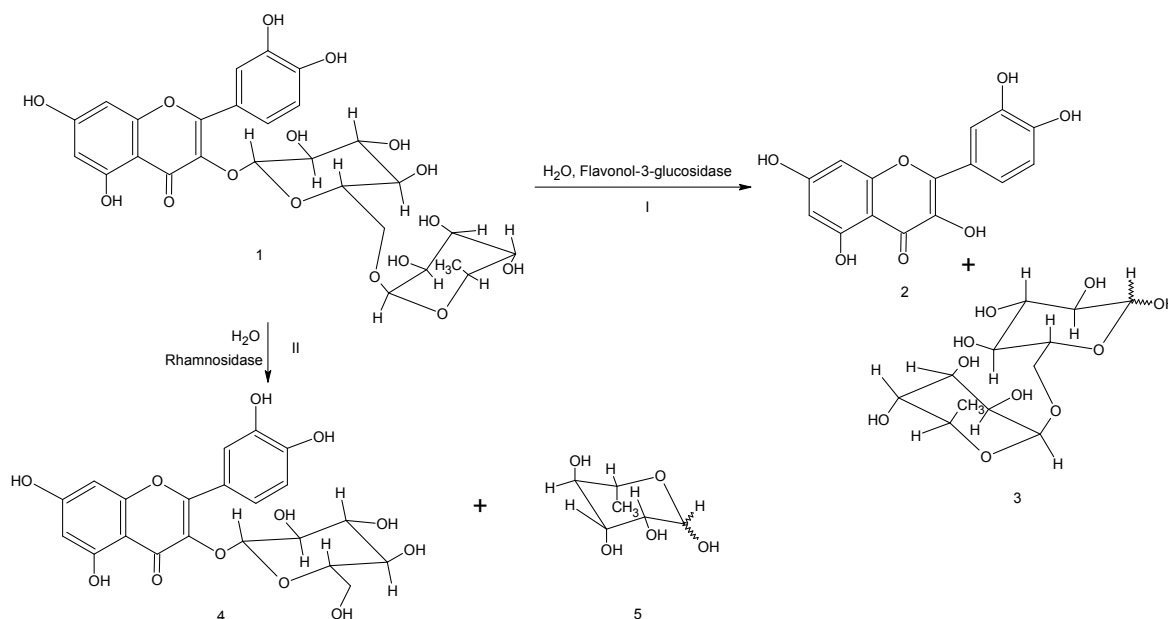


Abb. 3: Reaktionsschema

Rutin 1, Quercetin 2, Rutinose 3, Isoquercitrin 4, L-(+)-Rhamnose 5, Reaktion I katalysiert durch Flavonol-3-glucosidase soll unterbunden werden, Reaktion II katalysiert durch  $\alpha$ -L-Rhamnosidase angestrebt

Für die Entwicklung von Backwaren mit Mehl aus den Samen des Tatarischen Buchweizens ist eine Teigbereitung unerlässlich. Während allerdings Weizenmehl durch seine Inhaltsstoffe Klebereigenschaften mit sich bringt, muss z.B. Roggenmehl dagegen erst sauer aufgeschlossen werden (Belitz et al., 2001). Hierzu werden Milchsäurebakterien nutzbar gemacht. Zu diesen gehören u.a. die Spezies der stäbchenförmigen *Lactobacilli* wie *Lb. fermentum* und auch *Lb. plantarum* (Krämer, 2002). Bei diesen Spezies handelt es sich um aerotolerant anaerobe, grampositive Bakterien (Schlegel, 1992). Sie sind zur Energiegewinnung auf Kohlenhydrate angewiesen, wobei *Lb. fermentum* eine heterofermentative Art und *Lb. plantarum* eine homofermentative Art der Milchsäurebakterien repräsentiert (Schlegel, 1992). Nun werden zur Katalyse von Reaktion II aus Abb. 3 substratspezifische Glykosidasen, also Glykoside spaltende Enzyme aus der Gruppe der Hydrolasen (Karlson, 1980) benötigt. Die Fähigkeit zur Produktion einer  $\alpha$ -L-Rhamnosidase wird bei *Lb. plantarum* diskutiert (Dept. of Bioinformatics, 2009). Für diese Arbeit wurden Stämme dieser Spezies ausgewählt, da sie für die Katalyse der Reaktion II in Abb. 3 geeignet sein könnten (Dept. of Bioinformatics, 2009). Weiterhin wurden Stämme von *Lb. rhamnosus* eingesetzt. Deren Eignung zeigt sich durch ihre Eigenschaft, Rhamnose zu verwerten (Watanabe et al., 1992). Als Voraussetzung dafür, sind sie unter Umständen ebenfalls fähig, eine  $\alpha$ -L-Rhamnosidase zu produzieren. (Pham et al., 2000)

zeigen die Fähigkeit eines *Lb. rhamnosus*-Stamms zur Produktion einer solchen Rhamnosidase. Zusätzlich fand Hesperidinase aus *Aspergillus niger* Verwendung. Diese besitzt nachgewiesene  $\alpha$ -L-Rhamnosidase- und  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität (Sanchez et al., 1987).

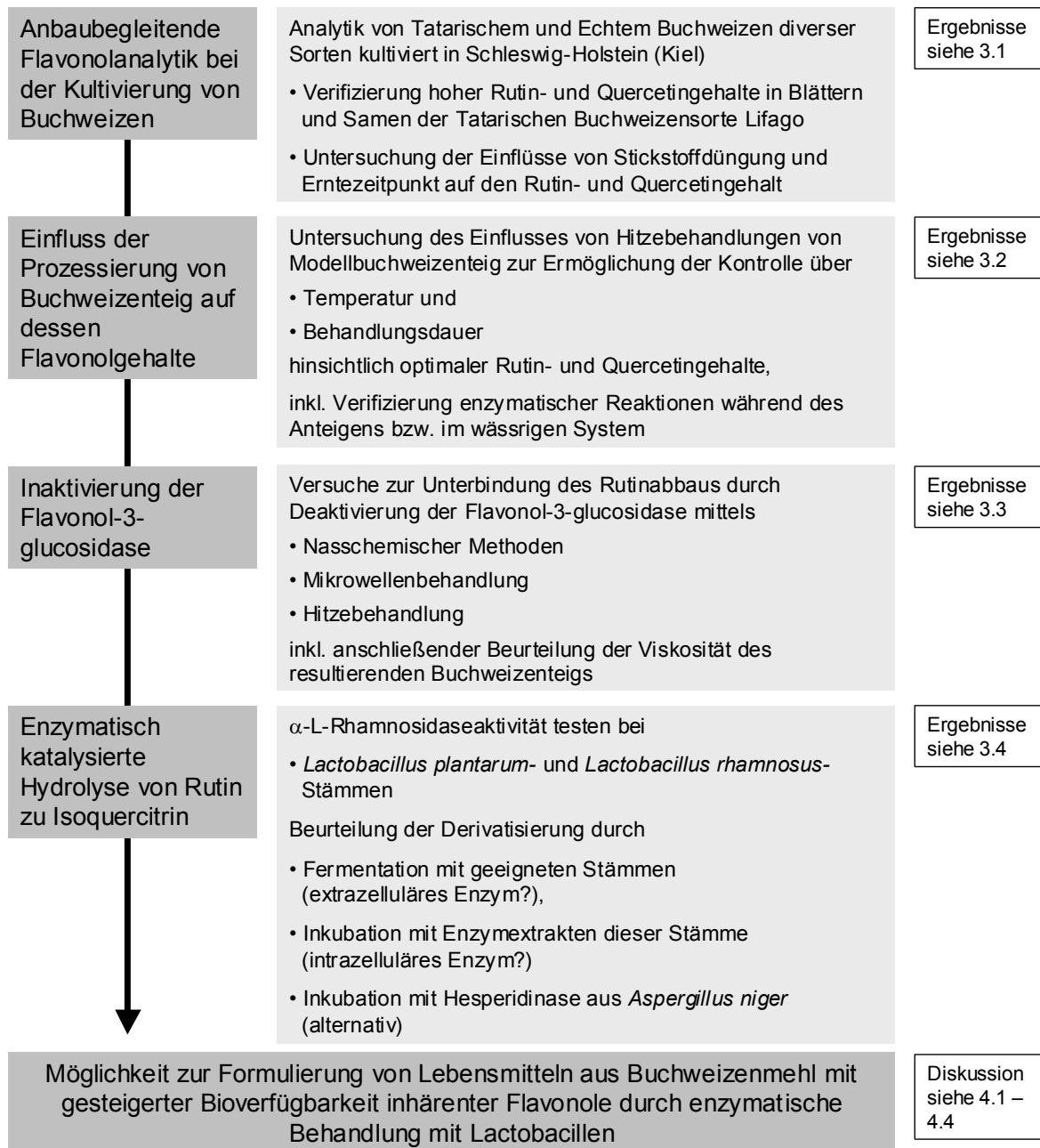


Abb. 4: Arbeitsfließschema mit aufeinander aufbauenden Teilzielen unter Berücksichtigung der Arbeitshypothesen im Hinblick auf einen Beitrag zur Formulierung eines funktionellen Lebensmittels aus Buchweizen

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Buchweizenmaterial**

Das gesamte Buchweizenmaterial für diese Arbeit stammte vom Versuchsgut Lindhof (Kiel) des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung, Ökologischer Landbau unter Prof. Taube an der CAU Kiel aus den Jahren 2007 und 2008 im Rahmen des EU-Projekts INTERREG IIIA, Pflanzen für die Gesundheit. Die Kultivierung von Buchweizen wurde freundlichst von Mitarbeitern, im besonderen von Dipl. Ing. agr. Frau M. Goeritz und Dr. R. Loges vom Institut für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung vollzogen. Das Saatgut hierfür wurde von verschiedenen Saatgutanbietern bezogen; Echter Buchweizen der Sorten Bamby von der Saatzucht Gleisdorf (Gleisdorf), Hruszowska von Camena-Samen (Lauenau am Deister) und Lileja von Feldsaaten Freudenberger (Duisburg), Tatarischer Buchweizen der Sorte Lifago von der Deutschen Saatveredelung (Lippstadt). Es wurden in beiden Jahren zu jeweils drei Ernteterminen (Vorblüte: 27.06.07, 23.06.08; Blüte: 24.07.07, 16.07.08.; Samenreife: 20.08.07, 26.08.08) jeweils zwei Parzellen (je 1,5 x 9 m) beprobt. Das Pflanzenmaterial wurde direkt beim Ernten auf Eis gehalten und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Material einer Gefriertrocknung (Christ, Gamma 1-20) unterworfen und bei – 18 °C gelagert. Die im Jahr 2007 geernteten Samen wurden durch Sieben aufgereinigt und mittels Kastentrocknung im Luftstrom getrocknet.

#### **2.1.2 Chemikalien**

Sofern nicht im Besonderen angegeben, waren alle verwendeten Chemikalien, Lösungsmittel und somit Mischungen und Lösungen aus jenen von analytischer oder, im entsprechenden Fall, von HPLC-Qualität. Bezugsquellen waren die Firmen Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (München), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt) und Becton Dickinson (Heidelberg).

### 2.1.3 Enzyme

Hesperidinase von *Aspergillus niger* (Sigma), gefriergetrocknet:

Synonym: Hesperidin- $\alpha$ -1,6-rhamnosidase (EC 3.2.1.40)

Aktivitäten:  $\alpha$ -L-Rhamnosidase- und  $\beta$ -D-Glucosidase (EC 3.2.1.21)

Unit-Definition: 3 U/g; eine „Unit“ (U) setzt 1,0  $\mu$ mol eines reduzierenden Zuckers aus Hesperidin pro Minute bei pH 3,8 und 40 °C frei

Zusammensetzung: Protein, ~ 2 % Biuret, Füllstoff Saccharose

### 2.1.4 Häufig verwendete Lösungen

- 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,5

50 mM Tris, pH mit konz. HCl eingestellt

- 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer, pH 3,8 und 5,5

0,1 M Na-Citrat, 0,1 M NaOH, 0,1 M HCl, pH mit konz. HCl eingestellt

- 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosidlösung

7 mM 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5)

- Hesperidinaselösung

1 % (*m/v*) Hesperidinase (0,03 U/mL) in 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8)



### 2.1.5 Organismen

Die folgenden Lactobacillen wurden freundlichst bereitgestellt vom Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie des Max Rubner-Instituts, Standort Kiel, Schleswig-Holstein, unter der Leitung von Herrn Prof. K. J. Heller.

Lb. plantarum 92260

Lb. plantarum 92265

Lb. plantarum K<sub>4</sub>Lb6

Lb. rhamnosus 92255                      von Ritu Rana, Indien

Lb. rhamnosus 92278 type              von Christian Hansen (Ringversuch 2005)

Lb. rhamnosus 92264                      DSM 20021

Lb. rhamnosus 92034                      alter Stamm, 1962

Lb. rhamnosus GG (ATCC 53103)

### 2.1.6 Nährmedien

- MRS-Bouillon (Merck), pH 5,5

Zusammensetzung (Angaben in g/L):

Pepton aus Casein (10,0), Fleischextrakt (8,0), Hefeextrakt (4,0), D-(+)-Glucose (20,0), Dikaliumhydrogenphosphat (2,0), Tween 80 (1,0), Diammoniumhydrogencitrat (2,0), Natriumacetat (5,0), Magnesiumsulfat (0,2), Mangansulfat (0,04)

pH mit konz. HCl eingestellt

- Modifizierte MRS-Bouillons, pH 5,5

Für einige Versuche wurde MRS-Bouillon ohne D-(+)-Glucose, also ohne herkömmliche Kohlenstoffquelle angesetzt. Weiterhin handelt es sich bei der Angabe MRS-Bouillon mit L-(+)-Rhamnose um MRS-Bouillon obiger Zusammensetzung, wobei D-(+)-Glucose durch L-(+)-Rhamnose der selben Menge substituiert wurde.

## 2.2 Allgemeine Methoden

### 2.2.1 Schälen der Samen des Tatarischen Buchweizens Lifago

Das Schälen der Buchweizensamen geschah mit Hilfe eines Unterläuferschälers (von und bei Firma Streckel & Schrader, Hamburg).

### 2.2.2 Mahlen von Buchweizensamen

Die Buchweizensamen wurden bei Raumtemperatur auf eine Partikelgröße von  $< 1,0$  mm prallgemahlen (IKA, MF 10, Prallmahlkopf MF 10.2, MF-Sieb, Durchmesser 1,00 mm).

### 2.2.3 Trockensubstanzgehalt

Der Trockensubstanzgehalt wurde errechnet aus dem Wassergehalt, bestimmt mittels Differenzwägung vor und nach Behandlung im Trockenschrank. Dafür wurden ca. 5 bis 10 g Buchweizenmaterial auf vier Dezimalstellen genau in konstantgewogene Aluminiumschälchen eingewogen und bei  $103 \pm 2$  °C im Trockenschrank (Memmert UE 500) bis zur Massenkonzanz getrocknet. Die Proben wurden  $\frac{1}{2}$  h im Exsikkator aufbewahrt und anschließend gewogen.

### 2.2.4 Buchweizenprobenvorbereitung

Die eigens etablierte Methode bediente sich dem Prinzip der Extraktion der Flavonole mit Methanol für eine anschließende Analyse mit Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Dazu wurde das gemahlene bzw. im Fall der Blätter mit einer Küchenmaschine zerkleinerte Buchweizenprobenmaterial in Extraktionshülsen auf vier Dezimalstellen genau eingewogen, mit 10 mL Methanol versetzt und abgedeckt mind. 4 h stengelassen. Danach wurde der Ansatz 1 min unter Eiskühlung mit dem Ultraschall-Homogenisator (Bandelin, Sonoplus HD 2200 mit Sonotrode MS 73, Power 70 %, Cycles 5) behandelt und anschließend zentrifugiert für 5 min bei 12557 rcf und 20 °C (Beckmann Coulter, Allegra 21 R, Rotor F0630). Die Ultraschallbehandlung und die Zentrifugation wurden jeweils dreimal mit je 5 mL Methanol wiederholt, die Überstände vereinigt und auf 25 mL aufgefüllt. Nach Filtration dieser Extraktlösung durch einen Faltenfilter (Macherey-Nagel MN 615  $\frac{1}{4}$ , 110 mm Durchmesser) wurde ca. 1 ml Filtrat in HPLC-*Vials* abgefüllt und mit der

HPLC gemessen (siehe 2.2.5). Gegebenenfalls musste die Einwage verändert oder eine Verdünnung vorgenommen werden, damit die gemessenen Signalfächen im linearen Bereich der Kalibriergeraden (siehe 2.2.6) waren.

Es sei angemerkt, dass laut Kreft et al. (2006) höhere Extraktionsausbeuten an Rutin in Echtem Buchweizen mit rund 70 % Methanol erreicht wurden als mit 100 % Methanol\*. Bei Buchweizensorten mit relativ hoher Flavonol-3-glucosidaseaktivität, wie z.B. der Sorte Lifago (siehe 2.2.9 und 3.3.1) führe der Wasseranteil allerdings zu einem Abbau des Rutins einhergehend mit einer geringeren Extraktionsausbeute. Um in dieser Arbeit besagten Einfluss bei der Sorte Lifago zu vermeiden und wiederum eine Vergleichbarkeit der Rutingehalte u.a. mit denen anderer Sorten zu gewährleisten, wurde allgemein, wie oben beschrieben, mit 100 % Methanol extrahiert. Außerdem wurde dafür Sorge getragen, dass eine angemessene Quellzeit eingehalten wurde, so dass das Eindringen des Lösungsmittels in die amorphen Bereiche des Buchweizenmaterials erleichtert wurde und die Lösbarkeit des nicht-kovalent gebundenen und an der Zellstruktur ausgerichteten Rutins verbessert wurde. Außerdem wurde mit drei Wiederholungen eine möglichst erschöpfende Extraktion durchgeführt.

### 2.2.5 Bestimmung von Rutin, Quercetin und Isoquercitrin mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

In dieser Arbeit wurden alle HPLC-Analysen an einer SHIMADZU LC-10 durchgeführt. Diese wurde als binäres Hochdruckgradientenelutionssystem montiert, bestehend aus zwei Pumpen (LC-10AT), einem Entgaser ERC-3114, Schaltventil FCV-11AL, Auto-Injektor SIL-10A mit Probenkühler und Injektionsspritze, Säulenofen CTO-10AC, UV-Vis-Detektor SPD-10A, Kommunikations-Bus-Modul CBM-10A und der Software CLASS-LC10 für Windows 95.

---

\* Nach Römpp (1995) ist Rutin wenig löslich in siedendem Wasser und Ethanol und Quercetin ist schwer löslich in Wasser aber leicht löslich in siedendem Ethanol. Das bedeutet: Will man beide Flavonole extrahieren und gleichzeitig eine Degradation, katalysiert durch die Flavonol-3-glykosidase, vermeiden, muss man einen Kompromiss hinsichtlich der im Pflanzenmaterial gemessenen Gehalte und der Gehalte *per se* eingehen.

Für die Chromatographie galten folgende Parameter (in Anlehnung an die Methode für Flavonolglykoside in Schwarztee nach Degenhardt et al. (2000):

Stationäre Phase:	Nucleodur 100-5 C18 (Machery-Nagel)
Mobile Phase:	Eluent A Wasser/ konz. Ameisensäure/ Acetonitril 89+2+9 (v/v/v) Eluent B Wasser/ konz. Ameisensäure/ Acetonitril 9+2+89 (v/v/v)
Fluss:	1,0 mL/min
Gradient:	0 min 7% B 3 min 17% B 12 min 35% B 15 min 93% B 17 min 93% B 19 min 7% B 21 min 7% B <i>Stoptime 27 min</i>
Säulenofentemperatur:	30 °C
Detektor:	UV 360 nm

Die Identifizierung erfolgte über Vergleich der Retentionszeiten mit denen von Standardsubstanzen, sowie der Aufstockung von Probelösungen mit Standardsubstanzen. Zur Bestätigung dieser qualitativen Befunde wurden Massenspektren angefertigt (siehe 2.2.7 und Anhang III.).

Die Berechnung der nach gelaufener Chromatographie erhaltenen Analysenwerte wurde mit den Geradengleichungen, erstellt mit Microsoft Excel 2000, extern aufgenommener Standardkalibrierreihen mit Bezug der Standardkonzentrationen auf die Signalfäche vorgenommen (siehe 2.2.6).

## 2.2.6 HPLC-Standardkalibrierungen

### 2.2.6.1 *Rutin*

Die Kalibrierung wurde mit Rutintrihydrat (Roth, Rotichrom® HPLC, Reinheit  $\geq 99$  %) vorgenommen. Hierfür wurden davon ca. 5 mg auf zwei Dezimalstellen genau eingewogen und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt. Weiterhin wurden 1:5-, 1:10-, 1:50-, 1:100-, 1:250- und 1:500-Verdünnungen angefertigt. Alle Lösungen wurden in HPLC-*Vials* abgefüllt und jeweils dreimal mit der HPLC gemessen (siehe 2.2.5). Die nach gelaufener Chromatographie über die CLASS-LC10-Software erhaltenen Signalfächen wurden gemittelt und mit Microsoft Excel

2000 in einem kartesischen Koordinatensystem gegen die entsprechenden resultierenden Konzentrationen aufgetragen. Anschließend wurde eine lineare Regression durchgeführt.

#### 2.2.6.2 Quercetin

Die Kalibrierung wurde mit Quercetindihydrat (Roth, Rotichrom® HPLC, Reinheit > 99 %) vorgenommen. Hierfür wurden davon ca. 5 mg auf zwei Dezimalstellen genau eingewogen und mit Methanol auf 10 mL aufgefüllt. Weiterhin wurden 1:5-, 1:10-, 1:50-, 1:100-, 1:250-, 1:500- und 1:1000-Verdünnungen angefertigt. Alle Lösungen wurden in HPLC-*Vials* abgefüllt und jeweils dreimal mit der HPLC gemessen (siehe 2.2.5). Die nach gelaufener Chromatographie über die CLASS-LC10-Software erhaltenen Signalflächen wurden gemittelt und mit Microsoft Excel 2000 in einem kartesischen Koordinatensystem gegen die entsprechenden resultierenden Konzentrationen aufgetragen. Anschließend wurde eine lineare Regression durchgeführt.

#### 2.2.6.3 Isoquercitrin

Die Kalibrierung wurde mit einem Isoquercitrinstandard (Roth, Rotichrom® ~CHR) vorgenommen. Hierfür wurden davon ca. 100 mg auf vier Dezimalstellen genau eingewogen und mit Methanol auf 100 mL aufgefüllt. Von dieser Stammlösung wurden 1:10-, 1:20-, 1:50-, 1:100-, 1:200- und 1:500-Verdünnungen angefertigt, in HPLC-*Vials* abgefüllt und mit der HPLC gemessen (siehe 2.2.5). Die nach gelaufener Chromatographie über die CLASS-LC10-Software erhaltenen Signalflächen wurden mit Microsoft Excel 2000 in einem kartesischen Koordinatensystem gegen die entsprechenden resultierenden Konzentrationen aufgetragen und es wurde eine lineare Regression durchgeführt.

### 2.2.7 Massenspektrometrie mit Elektrosprayionisierung

Die Bestätigung der Ergebnisse der qualitativen Bestimmung der Flavonole mittels HPLC (siehe 2.2.5) erfolgte mit HPLC-ESI-MS<sup>(2)</sup>. Hierzu wurden die Parameter der HPLC-Methode auf ein HPLC-System HP1100 mit DAD von Agilent übertragen. Ausnahme war hier der Fluss von 0,8 mL/min. Dieses System wurde gekoppelt mit einer Agilent 1100 Series LC/MSD Ionenfalle mit Elektrosprayionisierung. Der Zerstäubungsdruck betrug 60 psi und der Stick-

stofffluss betrug 10 L/min bei einer Trockengastemperatur von 350 °C. Die Messungen wurden von  $m/z$  100 bis 2200 im negativen Ionisierungsmodus vorgenommen.

Bei der Detektion galten folgende Parameter:

Kapillarspannung	3500 V
Kapillar Exit	- 158,5 V
Skim 1	- 40 V
Skim 2	5 V
Trap drive	45,0

MS<sup>2</sup> wurde durch Isolierung und Fragmentierung der detektierten Ionen vorgenommen. Als Kollisionsgas für die Fragmentierung der isolierten Substanzen in der Ionenfalle diente Helium.

### 2.2.8 Stabilität von Rutin und Quercetin in Buchweizenteig

Zur Kontrolle der Stabilität von Rutin und Quercetin in Buchweizenmehl wurde ein Modellsystem (Teig) aus Buchweizenmehl, aus ungeschälten Samen der Sorte Lifago und Wasser im Konvektomat bei verschiedenen Temperaturen behandelt. Hierfür wurde zunächst ein Gemisch aus 1 Massenteil Mehl und 2 Massenteilen Wasser angefertigt. Anschließend wurden in konstantgewogene Aluminiumschälchen ca. 35 g dieses Gemisches auf vier Dezimalstellen genau eingewogen und bei 150, 200 und 250 °C im Konvektomat (Zanussi FCV/E 10L6) behandelt. Das Zeitintervall zwischen der Fertigstellung des Gemisches und Beginn der Hitzebehandlung betrug jeweils genau 1 h. Es wurden Proben nach 5 und 10 min und dann in 10-min-Abständen entnommen. Endpunkt war eine sehr starke Braunfärbung. Anschließend wurden die Proben jeweils ½ h im Exsikkator gelagert. Die Probenvorbereitung für die Bestimmung von Rutin und Quercetin mittels HPLC erfolgte gemäß 2.2.4. Zusätzlich wurde unmittelbar vor dem Einwiegen der Probe in die Extraktionshülse die Aluminiumschale mit der vollständigen Probe gewogen. Nach der Probeneinwaage in die Hülse wurde die Probe sofort mit Methanol versetzt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

### *2.2.8.1 Beobachtung des Rutingehalts während der Quellung*

Um den Einfluss des Zeitintervalls nach Versetzen des Mehls ungeschälter Lifago-Samen mit Wasser (siehe oben), also der Quell- oder auch Anteigzeit auf den Rutin- und Quercetingehalt näher zu untersuchen, wurden während des Quellens nach bestimmten Zeiten ebenfalls von dem Mehl-Wasser-Gemisch ca. 1 g auf vier Dezimalstellen genau in Extraktionshülsen eingewogen und sofort mit 10 mL Methanol versetzt, um gemäß 2.2.4 fortzufahren. Die Probenahme erfolgte nach 6, 15, 25, 35 und 60 min.

### *2.2.8.2 Viskosität des Teigs*

Zur Überprüfung der Viskosität als Parameter für die Teigeigenschaft von angeteigtem Lifago-Mehl vor und nach Hitzebehandlung wurde eine entsprechende Messung vorgenommen. Dazu wurden jeweils 50 g Mehl genau eingewogen und mit 100 mL Wasser versetzt. Nach 1 h Quellzeit wurde die Viskosität am Viskosimeter (Haake, Visco Tester 7L, Spindel 2) bei Raumtemperatur mit 50 U/min bis zur Konstanz (1 min) gemessen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.

## **2.2.9 Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase**

### *2.2.9.1 Nasschemische Methoden*

Die Inaktivierung der im Buchweizenmehl des Tatarischen Buchweizens aktiven Flavonol-3-glucosidase wurde zunächst mit nasschemischen Methoden erprobt. Hierzu wurden ca. 1 bis 3 g Mehl aus ungeschälten Lifago-Samen auf vier Dezimalstellen genau in Extraktionshülsen eingewogen. Anschließend wurde das Mehl genau mit den doppelten Massenteilen folgender Flüssigkeiten versetzt:

- a) 60, 80 und 100 % Methanol,
- b) Wasser mit pH 1, 3, 7 und 10,

wobei die Probe mit pH 7 zugleich die Flavonol-3-glykosidase-positiv-Probe darstellt. Die Rutin-positiv-Probe bestand aus dem reinen unbehandelten Mehl. Nach 1 h Standzeit wurden die Proben gemäß 2.2.4 direkt mit 10 mL Methanol versetzt und weiter für die HPLC vorbereitet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.

### 2.2.9.2 Inaktivierung durch Mikrowellenbehandlung

Es erfolgte ein Versuch zur Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase durch Mikrowellenbehandlung. Ca. 0,5 g Mehl aus ungeschälten Lifago-Samen wurde in Extraktionshülsen auf vier Dezimalstellen genau eingewogen. Die Behandlung in einer kommerziellen Mikrowelle (Miele M 638 EC) erfolgte bei 900 W und 2450 MHz für jeweils 1, 2 und 3 min. Anschließend wurden die Hälfte der Proben mit Wasser in doppelten Massenteilen bezüglich der jeweiligen Einwaage versetzt und für 1 h stehen gelassen. Diese und die übrigen wasserfreien Proben (Flavonol-3-glucosidase-negativ-Proben) wurden gemäß 2.2.4 für die HPLC vorbereitet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.

### 2.2.9.3 Inaktivierung durch Hitzebehandlung

Ein Vergleich der Methoden zur Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase durch Hitzebehandlung für 24 h bei 85 °C nach Suzuki et al. (2004) und Hitzebehandlung für 24 h bei 150 °C wurde angestellt. Dazu wurden ca. 0,5 g Mehl aus ungeschälten Lifago-Samen in Extraktionshülsen auf vier Dezimalstellen genau eingewogen. Die Hitzebehandlungen erfolgten im Trockenschrank (Memmert UE 500). Anschließend wurden die Proben mit Wasser in doppelten Massenteilen in Bezug auf die jeweilige Einwaage versetzt und für 1 h stehen gelassen. Diese und hitzebehandelte, jedoch nicht mit Wasser versetzte Proben (Rutin-positiv-Proben) wurden gemäß 2.2.4 für die HPLC vorbereitet. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Anzuchsbedingungen

Die Kultivierung sowohl der *Lb. plantarum*- als auch der *Lb. rhamnosus*-Stämme wurde in MRS-Bouillon (pH 5,5) im Brutraum bei 37 °C vorgenommen.



### 2.3.2 Optische Dichte

Die Messung der Optischen Dichte (OD) der Zellsuspensionen erfolgte am Photometer (Macherey-Nagel, Nanocolor 250D) durch Messung der Extinktion bei 620 nm gegen das entsprechende Medium.

### 2.3.3 Zellwachstumsversuche

Für Wachstumsversuche wurden Zellen der *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämme aus Übernachtskulturen (siehe 2.3.1), aus jeweils 10 mL MRS-Bouillon, durch Zentrifugation für 10 min, bei 8204 rcf und 4 °C (Beckman, J2-21 Centrifuge, Rotor JA25.50) geerntet. Die Zellpellets wurden einmal mit 5 mL MRS-Bouillon ohne Glucose gewaschen und anschließend in 10 mL MRS-Bouillon ohne Glucose resuspendiert. Während der einzelnen Schritte wurden die Zellen so weit möglich eisgekühlt. Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden 1%ig in 10 mL MRS-Bouillon unterschiedlicher Zusammensetzung enthaltende Kulturröhrchen überimpft und im Wasserbad bei 37 °C kultiviert. Bei den Flüssigmedien handelte es sich um

- a) MRS-Bouillon (pH 7,5) ohne D-(+)-Glucose als Kohlenstoffquelle,
- b) MRS-Bouillon (pH 7,5) mit 2 % L-(+)-Glucose (*m/v*) als Kohlenstoffquelle,
- c) MRS-Bouillon (pH 7,5) mit 2 % Rhamnose (*m/v*) als Substituent für Glucose.\*

Die Beobachtung des Zellwachstums erfolgte über die Messung der OD<sub>620</sub> (siehe 2.3.2) zu Beginn der Kultivierung und weiterhin nach 2, 4, 6, 8 und 24 h.

### 2.3.4 Beobachtung des Einflusses von Ethanol auf das Zellwachstum

Ein potentieller Einfluss von Ethanol auf das Zellwachstum von *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämmen wurde an Zellen aus Übernachtskulturen getestet. Diese wurden 1%ig in 100-mL-Ärmchenkolben überimpft, bis zu einer OD<sub>620</sub> von ca. 0,2 bei 37 °C kultiviert und

---

\* Analog wurden Zellen in einem zusätzlichen Flüssigmedium kultiviert: MRS-Bouillon (pH 7,5) mit 10 Volumenanteilen einer 10%igen ethanolischen Rutinlösung (resultierend in 1 % Rutin und 10 % Ethanol im Ansatz). Während der Kultivierung war aufgrund der Ausflockung des Rutins im Medium keine eindeutige Bestimmung der OD möglich.

anschließend eisgekühlt. Aliquots der erhaltenen Kulturen wurden in separate Kulturröhrchen überführt und mit bestimmten Volumina Ethanol versetzt, resultierend in 10-mL-Ansätzen mit Volumenanteilen Ethanol von 1, 3, 5, 7 und 9 %. Zu Beginn der Inkubation und weiterhin nach 10, 30, 60, 90 und 120 min im Falle der Stämme von *Lb. rhamnosus* und nach 10, 20, 30, 75 und 120 min im Falle der Stämme von *Lb. plantarum* wurde die OD<sub>620</sub> gemessen.

### 2.3.5 Fermentation von Rutin mit *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämmen

Es wurden Versuche unternommen, Rutin fermentativ mit Hilfe von Zellen der *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämme zum 3-O-Glucosid Isoquercitrin abzubauen. Zu diesem Zweck wurden die Stämme jeweils 1%ig aus Übernachtskulturen in 10 mL MRS-Bouillon überimpft und bis zur log-Phase, also einer OD<sub>620</sub> von ca. 0,3 bis 0,5, im Wasserbad bei 37 °C kultiviert und anschließend auf Eis gehalten. Die Fermentation erfolgte durch Zugabe von 0,5 mL einer 1%igen (m/v) ethanolischen Rutinlösung, resultierend in 0,05 % Rutin (m/v) und 5 % Ethanol (v/v), im Wasserbad bei 37 °C. Nach 24 h wurden die erhaltenen Suspensionen mit 10 mL Ethanol versetzt und mikrofiltriert. In gleicher Weise wurde die Rutinlösung in reinem Medium behandelt. Anschließend wurden die Lösungen in HPLC-Vials abgefüllt und in die HPLC injiziert (siehe 2.2.5).

### 2.3.6 Gewinnung von Enzymextrakten durch Zellaufschluss

Die Stämme von *Lb. plantarum* und *Lb. rhamnosus* wurden 1%ig in 100 mL MRS-Bouillon überimpft und bis zu einer OD<sub>620</sub> von ca. 1,0 im Brutraum bei 37 °C kultiviert und anschließend eisgekühlt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min, bei 8204 rcf und 4 °C geerntet (Beckman, J2-21 Centrifuge, Rotor JA25.50) und dreimal mit 10 mL 50mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) gewaschen. Die Masse der Zellpellets wurde über Differenzwägung bestimmt. Die Proben wurden zu jeder Zeit, soweit möglich, auf Eis gehalten.

Zum Aufschluss wurden ca. 400 mg Zellen in 500 µL 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) re-suspendiert und mit 1100 mg Glasperlen (Durchmesser < 0,11 mm) in 2-mL-Schraubdeckelcups gemischt.

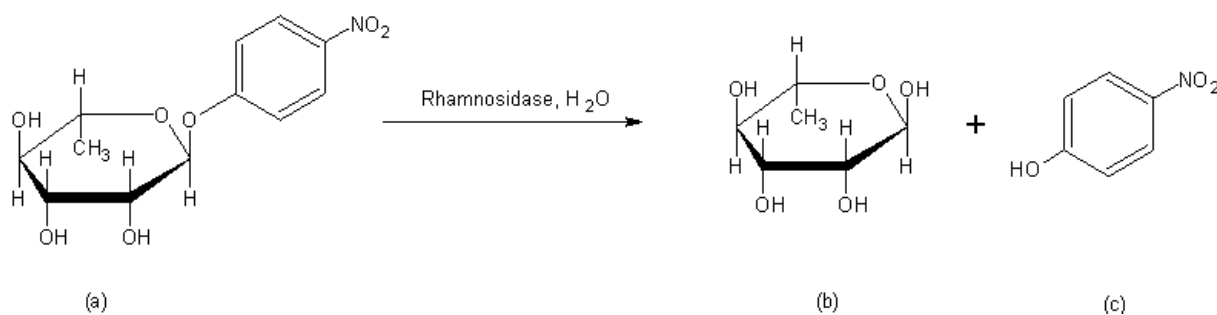
Der Aufschluss der Zellen erfolgte in einer *Fastprep*-Zellmühle (Savant, Bio 101, FP 120-230) in acht 10 sec-Intervallen bei einer Geschwindigkeitseinstellung von 5,5 und jeweils 2 min Pause unter ständiger Kühlung der Proben. Der Aufschluss wurde mikroskopisch kontrolliert.

Anschließend wurde die Glasperlen-Zellsuspension mit 400  $\mu\text{L}$  50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) versetzt, gemischt und für 10 min bei 20800 rcf und 4 °C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Der Überstand wurde abgenommen und in ein Kulturröhrchen überführt. Die Glasperlen-Zellsuspension wurde ein zweites mal mit 525  $\mu\text{L}$  Puffer versetzt, gemischt und zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde mit dem ersten vereinigt.

Die zellfreien, groben Enzymextrakte (resultierendes Volumen: 1,425 mL) wurden sowohl direkt im Testsystem zur Bestimmung von Rhamnosidase-Aktivitäten (siehe 2.3.7) als auch für die Inkubation mit Rutin (siehe 2.3.8) eingesetzt. Bei letzterer wurde der Aufschluss ergänzend auch mit 1 M HCl/Na-Citratpuffer (pH 5,5) durchgeführt.

### 2.3.7 Testsystem zum Nachweis von Rhamnosidaseaktivitäten der Enzymextrakte von *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämmen

Der Nachweis der Rhamnosidaseaktivität erfolgte über ein eigens etabliertes System mit sichtbarer und auch photometrisch detektierbarer Farbreaktion in Anlehnung an die Methode von Romero et al. (1985) zum Testen der Rhamnosidaseaktivität von Naringinase. Als Substrat wurde 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid (a) eingesetzt. Durch enzymatisch katalysierter Hydrolyse werden  $\alpha$ -L-Rhamnopyranose (b) und 4-Nitrophenol (c) gemäß folgender Reaktionsgleichung freigesetzt:



Die Reaktion kann detektiert werden durch das Auftreten einer intensiv gelben Farbe, verursacht durch das 4-Nitrophenol im alkalischen Milieu.

Es wurde eine Positivkontrolle mit Hesperidinase von *Aspergillus niger* durchgeführt; eine Hesperidin- $\alpha$ -1,6-rhamnosidase mit  $\alpha$ -L-Rhamnosidase- und  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivitäten (siehe 2.1.3).

Die Ansätze wurden in Kulturröhrchen mit 1,425 mL Enzymextraktlösung (siehe 2.3.6) und Zugabe von 75  $\mu$ L 7 mM 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosidlösung zum Starten der Reaktion bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach 10, 100 und 1000 min Inkubation wurden von diesen Ansätzen 300  $\mu$ L abgenommen und in Mikrokunststoffküvetten mit einer Vorlage von 700  $\mu$ L 1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung\* überführt. Entsprechend wurde eine Positivkontrolle mit 750  $\mu$ L Hesperidinaselösung und 75  $\mu$ L 7 mM 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosidlösung in 725  $\mu$ L 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) behandelt. Eine Negativkontrolle erfolgte analog, wobei anstelle der Hesperidinaselösung Volumenäquivalente des 50 mM Tris/HCl-Puffers (pH 7,5) eingesetzt wurden. Es folgte eine Messung der Absorption bei 420 nm in Kunststoffküvetten (1 cm) gegen die Negativkontrolle am Photometer (Analytik Jena, Specord 50 mit Software WinAspect 2.2.7.0).

### 2.3.8 Hydrolyse von Rutin mit Enzymextrakten von *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämmen

Analog dem Prinzip des Testsystems zum Nachweis von Rhamnosidaseaktivitäten (siehe 2.3.7) wurden die Enzymextrakte direkt mit Rutin inkubiert. Die Ansätze wurden in Kulturröhrchen mit jeweils 1,425 mL Enzymextrakt, aufgeschlossen mit und gelöst in

- a) 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) und
- b) 1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 5,5),

(siehe 2.3.6) und Zugabe von 75  $\mu$ L 1%iger ethanolischer Rutinlösung zum Starten der Inkubation bei 37 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach 16, 40 und 64 h wurden von diesen Ansätzen 300  $\mu$ L abgenommen und in eine Vorlage von 700  $\mu$ L Ethanol überführt. Entsprechend wurden Rutinstandardkontrollen behandelt, wobei anstelle der groben Enzymextraktlösungen

---

\* Romero et al. (1985) benutzten 1 M NaOH. Diese hatte hier allerdings zu scheinbar positiven Ergebnissen geführt, da vermutlich eine basisch katalysierte Hydrolyse des  $\alpha$ -L-Rhamnopyranosidrests erfolgt war, wodurch auch die Negativkontrolle eine sichtbar gelbe Färbung gezeigt hatte.

Volumenäquivalente der entsprechenden Pufferlösungen eingesetzt wurden. Anschließend wurden die erhaltenen Lösungen mikrofiltriert, in HPLC-*Vials* abgefüllt und jeweils 10 µL in die HPLC injiziert (siehe 2.2.5). Es wurden von allen Ansätzen Doppelbestimmungen vorgenommen.

### 2.3.9 Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase

Ein Versuch zur Überführung von Rutin in Isoquercitrin durch Hydrolyse mit Hesperidinase wurde durchgeführt. Dazu wurden jeweils in Schraubdeckelglasgefäßen

- a) 1,5 mL 1%iger ethanolischer Rutinlösung mit 3,75 mL Hesperidinaselösung und 24,75 mL 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8) und
- b) 1,5 mL 1%iger ethanolischer Rutinlösung mit 28,5 mL 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8)

gegeben und bei 40 °C im Wasserbad inkubiert. Nach 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 und 180 min wurden von den Inkubationslösungen 200 µL abgenommen und zu einer Vorlage von 800 µL EtOH gegeben. Anschließend wurden die erhaltenen Lösungen mikrofiltriert und in HPLC-*Vials* abgefüllt. Von den Proben wurden 10 µL in die HPLC injiziert (siehe 2.2.5.). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.

### 2.3.10 Behandlung von Buchweizenmehl mit Hesperidinase

Analog zum Prinzip der Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase (siehe 2.3.7) wurde der Versuch unternommen, Rutin im Mehl der Sorte Lifago des Tatarischen Buchweizens, nach Schälen und Hitzebehandlung (siehe 2.2.1 und 2.2.9) durch Hydrolyse mit Hesperidinase in Isoquercitrin zu überführen. Hierfür wurden 2 g Lifago-Mehl (geschält, hitzebehandelt), 4,5 mL H<sub>2</sub>O und 0,5 mL Ethanol in Schraubdeckelgefäßen gemischt und mit 2,5 mL Hesperidinaselösung sowie 12,5 mL 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8) versetzt. Inkubiert wurde bei 40 °C im Schüttelwasserbad (Köttermann, Geschwindigkeitseinstellung Stufe 1). Nach bestimmten Zeiten wurden vom Ansatz 200 µL abgenommen und zu einer Vorlage von 800 µL Ethanol gegeben. Anschließend wurden die erhaltenen Lösungen mikrofiltriert, in HPLC-*Vials* abgefüllt und jeweils 10 µL in die HPLC injiziert (siehe 2.2.5). Es wurden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.

## 2.4 Statistische Methoden

Unterschiede der Samen der vier Buchweizensorten hinsichtlich ihres Rutin- bzw. Quercetinsgehalts wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalysen untersucht. Unabhängige Variablen waren „Sorte“ (Bamby, Hruszowska, Lileja, Lifago) und „Düngung“ (0 kg N/ha, 120 kg N/ha), die abhängigen Variablen waren jeweils „Rutin, mg/kg TS“ und „Quercetin, mg/kg TS“. Die Blätter wurden in analoger Weise untersucht, mit der zusätzlichen unabhängigen Variablen „Erntezeitpunkt“ (Vorblüte, Blüte, Samenreife). Zur Überprüfung der Hypothese, die Tatarische Buchweizensorte Lifago habe einen höheren Rutingehalt als jede der drei übrigen Echten Buchweizensorten, wurden geplante (a priori) Kontraste verwendet. Signifikante Unterschiede im Rutingehalt der übrigen Sorten wurden mittels post-hoc Test mit Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche ermittelt. Die Daten für die beiden abhängigen Variablen umfassen jeweils Mittelwerte einer Doppelbestimmung der Rutin- bzw. Quercetinsgehalte mittels HPLC (siehe Anhang I. und II.). Dabei sind die Gehalte der Blätter in den Jahren 2007 und 2008 als unabhängige Größen zusammengefasst. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  zugrundegelegt.

Alle Statistischen Auswertungen wurden mit SPSS Version 15.0.1 vorgenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Rutin und Quercetin in Buchweizen

##### 3.1.1 Rutin und Quercetin in Buchweizensamen von Saatgutanbietern

Eingangs wurden die Buchweizensamen verschiedener Saatgutanbieter (siehe 2.1.1) vor der Kultivierung auf ihren Gehalt an Rutin, dem massenanteilig häufigsten Flavonoid in Buchweizen, und seinem Aglykon Quercetin mittels HPLC untersucht (siehe 2.2.2, 2.2.4, 2.2.5). Das Ergebnis der Quantifizierung der Rutingehalte ist in Abb. 5 dargestellt.

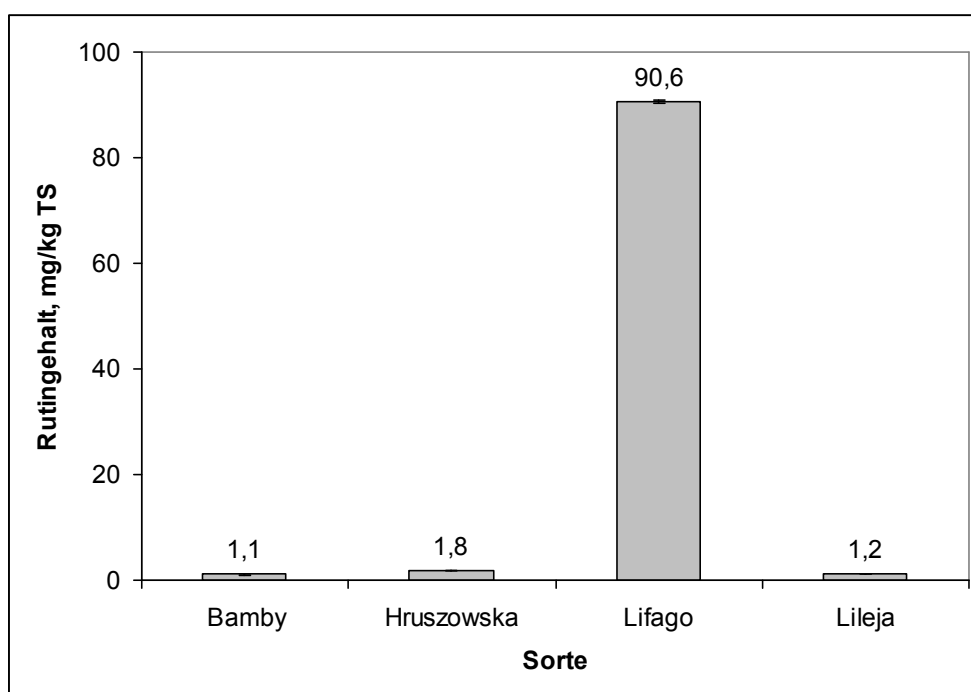


Abb. 5: Vergleich der Rutingehalte von Buchweizensamen verschiedener Sorten von Saatgutanbietern

Ungeschälte Samen der Sorten Bamby, Hruszowska, Lifago und Lileja; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$

Die Quercetiningehalte waren unterhalb der Bestimmungsgrenze und konnten daher nicht in Abb. 5 dargestellt werden. Die Rutingehalte der Sorten des Echten Buchweizens Bamby mit 1,1 mg/kg TS, Hruszowska mit 1,8 mg/kg TS und Lileja mit 1,2 mg/kg TS unterschieden sich unwesentlich voneinander. Die Sorte des Tatarischen Buchweizens Lifago dagegen enthielt mit 90,6 mg Rutin pro kg TS ungeschälter, gemahlener Samen rund 70 mal mehr Rutin als die Sorten seiner verwandten Art.

### 3.1.2 Rutin und Quercetin im Samenmaterial verschiedener Buchweizenarten und -sorten

Die Analytik hinsichtlich Rutin und Quercetin in Buchweizensamen der Tatarischen Buchweizensorte Lifago und der Echten Buchweizensorten Bamby, Hruszowska und Lileja nach 2.2.2, 2.2.4 und 2.2.5 inklusive der statistischen Datenanalyse nach 2.4 wird im folgenden behandelt. Abb. 6 zeigt exemplarisch ein HPLC-Chromatogramm eines Buchweizensamens nach Extraktion mit Methanol.

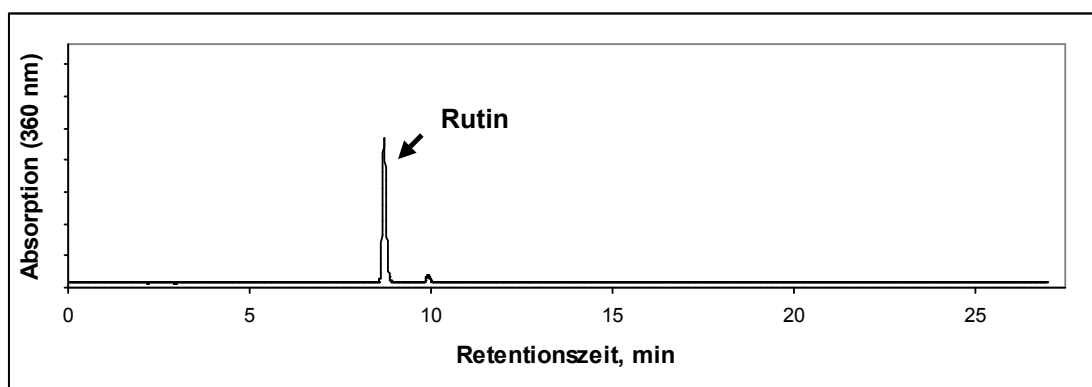


Abb. 6: HPLC-Chromatogramm vom Extrakt von Buchweizensamen der Sorte Lifago  
Messung mittels RP-HPLC bei 360 nm mit Gradientenelution, Rutin ( $m/z$  609  $[M-H]^-$ )

Im Chromatogramm (Abb. 6) war ein deutliches Signal des dominierenden Flavonoids Rutin verzeichnet (siehe auch Anhang III.). Bei dem schwachen Signal nach 9,9 min handelte es sich um Spuren eines Kämpferolderivats mit einer Molekülmasse von 593 (HPLC-ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus) und  $m/z$  285 für das Hauptfragmention.

Das Ergebnis der Gehaltsbestimmungen von Rutin und Quercetin in ungeschälten Samen von Sorten des Tatarischen und Echten Buchweizens, gewonnen im Zuge der Freilandversuche zeigt Abb. 7.



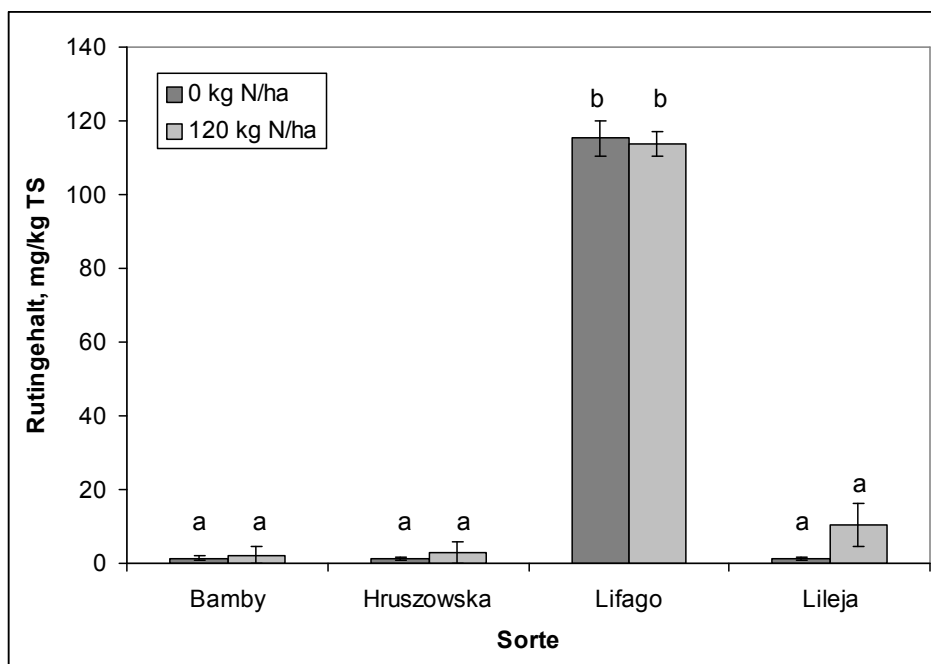


Abb. 7: Ruttingehalte in mg/kg TS in Buchweizensamen verschiedener Sorten aus Freilandversuchen

ungeschälte Samen, Ernte 2007, Stickstoffdüngung: 0 bzw. 120 kg N/ha; Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Balken mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ( $p < 0,05$ ),  $n = 3$

Hinsichtlich der Ruttingehalte unterschieden sich die Tatarische Sorte Lifago mit rund 115 mg/kg TS ohne und 114 mg/kg TS mit Stickstoffdüngung stark von den übrigen Sorten des Echten Buchweizens. Bei der Sorte Bamby ließen sich Ruttingehalte von 1,4 mg/kg TS ohne Düngung bzw. 2,3 mg/kg TS mit 120 kg Stickstoff pro ha ermitteln. Bei der Sorte Hruszowska konnten Ruttingehalte von 1,2 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 2,9 mg/kg TS (mit Düngung) bestimmt werden. Die Sorte Lileja zeigte Ruttingehalte von 1,3 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 10,5 mg/kg TS (mit Düngung). Eine Stickstoffdüngung von 120 kg N/ha übte keinen signifikanten Einfluss auf die Ruttingehalte aller Sorten.

Quercetin war in allen Samen unabhängig von der Sorte in Spuren nachweisbar. Folglich konnten die Quercetiningehalte der Samen nicht als unabhängige Variable bei der Varianzanalyse berücksichtigt werden.

Die geplanten Kontraste der univariaten Varianzanalyse nach 2.4 ergaben signifikant höhere Ruttingehalte in den Samen der Tatarischen Buchweizensorte Lifago als jeweils in den Samen jeder der drei übrigen Sorten des Echten Buchweizens ( $p < 0,001$ ). Beim post-hoc Test ließen

sich keine weiteren signifikanten Sortenunterschiede ermitteln. Weiterhin erreichten weder der Haupteffekt für „Düngung“ noch die Interaktion aus „Sorte“ und „Düngung“ Signifikanz, d.h. hinsichtlich der Rutingehalte im Samen bestand kein Unterschied zwischen Buchweizen mit und ohne Stickstoffdüngung.

### 3.1.3 Rutin und Quercetin im Blattmaterial verschiedener Buchweizenarten und -sorten

Anbaubegleitend wurden die Bestimmungen der Rutin- und Quercetiningehalte des Buchweizenblattmaterials aus den Jahren 2007 und 2008 nach 2.2.2, 2.2.4 und 2.2.5 mit anschließender statistischer Datenanalyse nach 2.4 durchgeführt. Abb. 8 zeigt exemplarisch ein HPLC-Chromatogramm von Buchweizenblättern nach Extraktion mit Methanol.

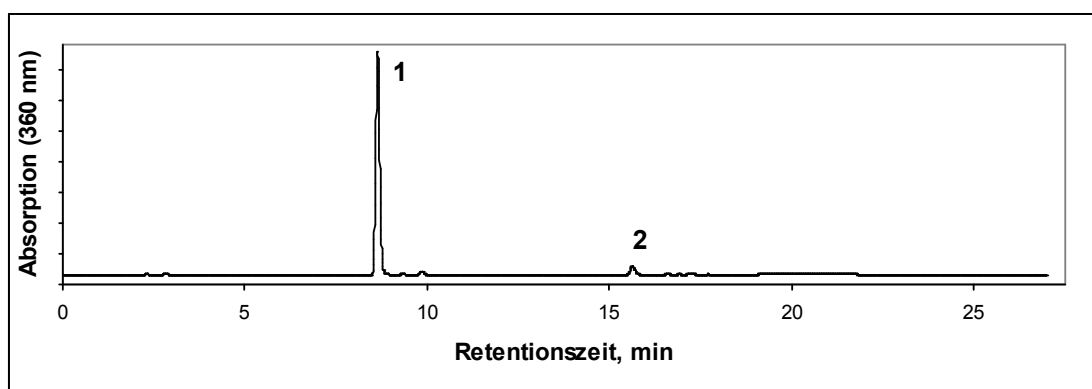


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm vom Extrakt von Buchweizenblättern der Sorte Lifago Messung mittels RP-HPLC bei 360 nm mit Gradientenelution, Rutin **1** ( $m/z$  609  $[M-H]^-$ ), Quercetin **2** ( $m/z$  301  $[M-H]^-$ )

Im Chromatogramm war ein starkes Rutinsignal (1) sowie ein schwaches Quercetinsignal (2) zu sehen. Bei dem sehr schwachen Signal nach 9,4 min handelte es sich um Spuren eines Quercetinmonoglykosids mit einer Molekülmasse von 463 (HPLC-ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus) und  $m/z$  301 für das Hauptfragmention. Das schwache Signal nach 9,9 min rührte von Spuren eines Kämpferolderivats mit einer Molekülmasse von 593 (HPLC-ESI-MS im negativen Ionisierungsmodus) und  $m/z$  285 für das Hauptfragmention.

Die Ergebnisse der Rutingehaltsbestimmungen im Blattmaterial der Echten Buchweizensorten Bamby, Hruszowska und Lileja sowie der Tatarischen Buchweizensorte Lifago zu drei Erntezeitpunkten sind in Abb. 9 dargestellt.

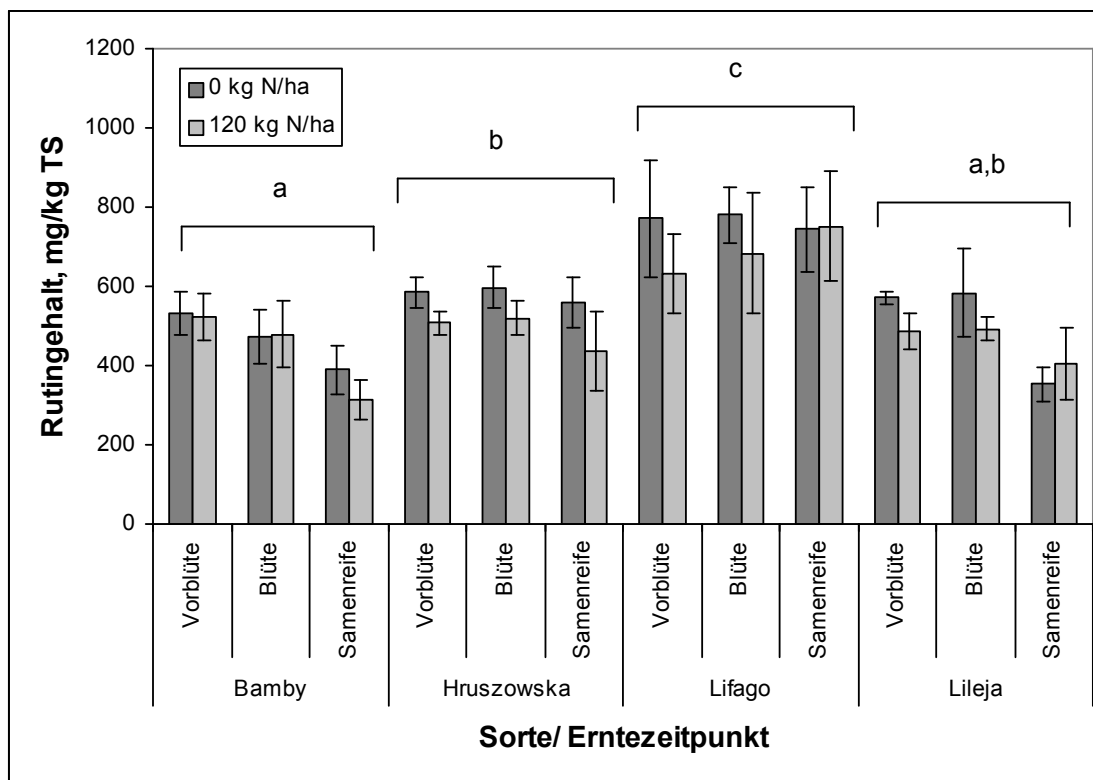


Abb. 9: Rutingehalte in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten zu verschiedenen Erntezeitpunkten

Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Sorten mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ( $p < 0,05$ )  $n = 4$

Die Rutingehalte betrugen im Mittel der jeweiligen Erntezeitpunkte für die Sorte Bamby rund 465 mg/kg TS ohne und 438 mg/kg mit Stickstoffdüngung von 120 kg N/ha. Entsprechend wurden bei der Sorte Hruszowska Rutingehalte von 579 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 488 mg/kg TS (mit Düngung) ermittelt. Die Sorte Lifago besaß im Mittel Rutingehalte von 765 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 689 mg/kg TS (mit Düngung). Bei der Sorte Lileja waren dies 503 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 461 mg/kg TS (mit Düngung).

Die geplanten Kontraste der univariaten Varianzanalyse nach 2.4 ergaben hier signifikant höhere Rutingehalte in den Blättern der Tatarischen Buchweizensorte Lifago als jeweils in den Blättern jeder der übrigen drei Sorten des Echten Buchweizens ( $p < 0,001$ ). Beim post-hoc Test ließen sich weitere signifikante Sortenunterschiede ermitteln. So ergaben sich höhere

Rutingehalte in den Blättern der Sorte Hruszowska als in denen der Sorte Bamby ( $p = 0,006$ ), jedoch nicht signifikant höher als die Gehalte in der Sorte Lileja ( $p = 0,207$ ). Für die Sorte Lileja wiederum wurden bei den Gehalten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu denen der Sorten Hruszowska und Bamby ermittelt.

Das Ergebnis der Varianzanalyse nach 2.4 hinsichtlich des Einflusses des Erntezeitpunkts auf den Rutingehalt der Blätter ist in Abb. 10 als Profildiagramm dargestellt.

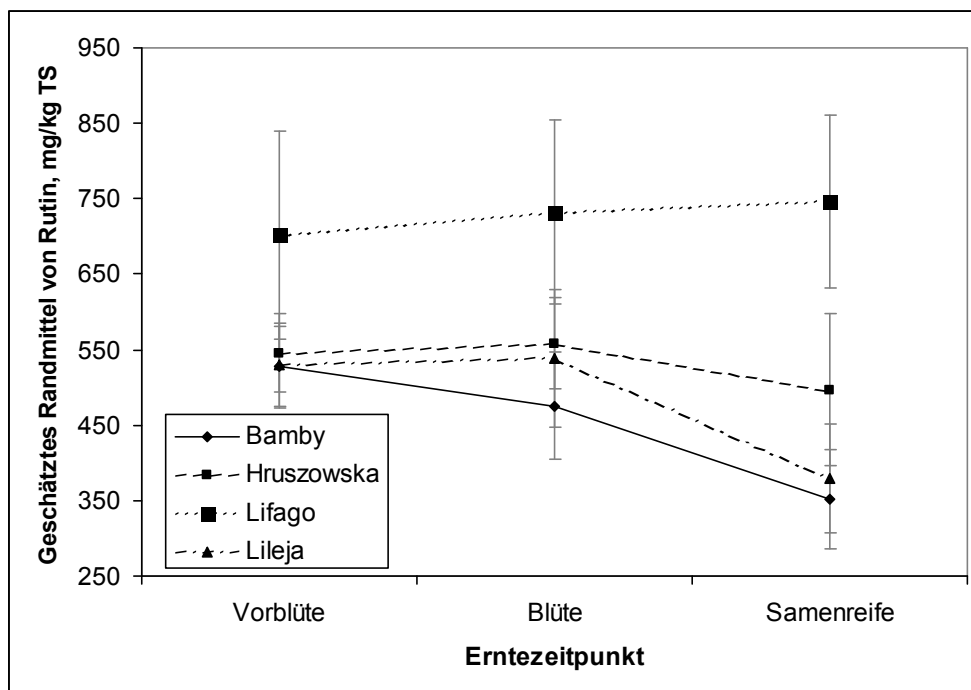


Abb. 10: Einfluss des Erntezeitpunkts auf den mittleren Rutingehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig von der Düngung), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse

Geschätztes Randmittel aus der deskriptiven Statistik, Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Signifikanz bei  $p < 0,05$ ,  $n = 8$

Sowohl der Haupteffekt für „Erntezeitpunkt“ erreichte bei den mittleren Rutingehalten Signifikanz ( $p < 0,001$ ), als auch die Interaktion aus „Erntezeitpunkt“ und „Sorte“ ( $p = 0,005$ ). Hinsichtlich des Rutingehalts unterschied sich der Einfluss des Erntezeitpunkts je nach Sorte. Anhand des Profildiagramms mit geschätzten Randmitteln der Rutingehalte aus der Varianzanalyse (siehe Abb. 10) wurde abgeleitet, dass dieser Einfluss bei den Sorten des Echten Buchweizens (Bamby, Hruszowska, Lileja) stärker ausgeprägt war, als bei der Tatarischen Buchweizensorte Lifago. Bei den Sorten des Echten Buchweizens gab es demnach im Verlauf der Anbauperiode eine Abnahme der Rutingehalte in den Blättern. Der Trend für die Gehalte

der Sorten Hruszowska und Lileja deutete die höchsten Rutingealte zum Erntezeitpunkt Blüte mit 558 mg/kg TS bzw. 538 mg/kg TS an. Der Trend bei der Sorte Bamby deutete eine stetige Abnahme an. Beim Zeitpunkt Vorblüte wurde im geschätzten Randmittel ein Rutingealt von 528 mg/kg TS, zur Samenreife von 351 mg/kg TS verzeichnet. Die Rutingealte der Sorte Lifago dagegen deuteten eine unwesentliche Zunahme der Rutingealte mit einem geschätzten Randmittel von 747 mg/kg TS zum Zeitpunkt Samenreife an.

Das Ergebnis der Varianzanalyse hinsichtlich des Einflusses der Stickstoffdüngung auf den Rutingealt der Blätter ist in Abb. 11 als Profildiagramm dargestellt.

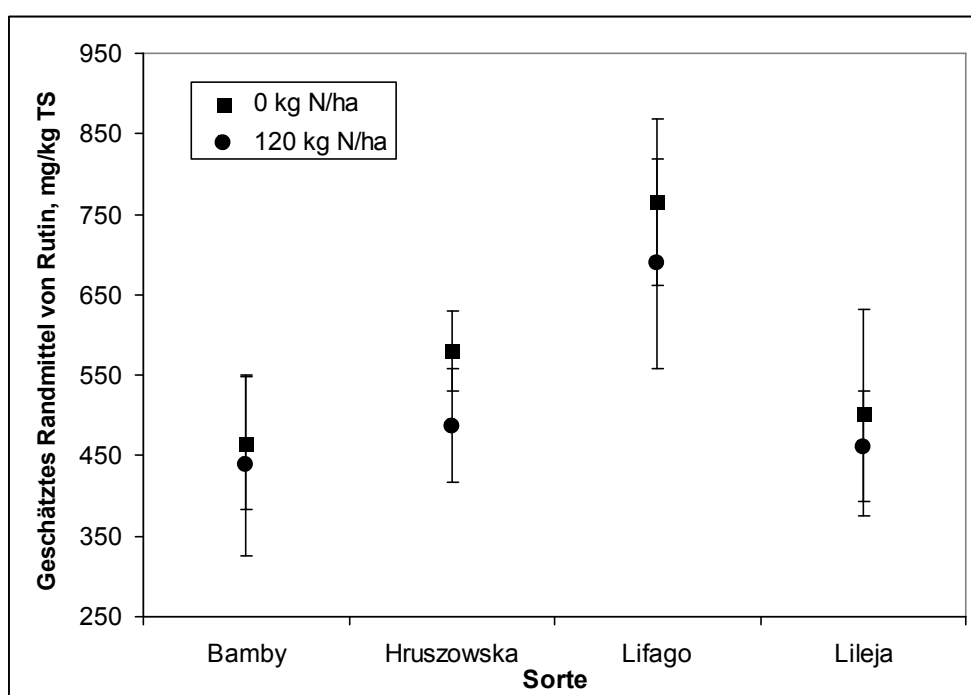


Abb. 11: Einfluss der Stickstoffdüngung auf den mittleren Rutingealt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig vom Erntezeitpunkt), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse

Geschätztes Randmittel aus der deskriptiven Statistik, Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Signifikanz bei  $p < 0,05$ ,  $n = 12$

Der Haupteffekt für „Düngung“ war für die mittleren Rutingealte in Blättern signifikant ( $p = 0,001$ ), die Interaktion aus „Düngung“ und „Sorte“ hingegen nicht. Das bedeutet, auf die Rutingealte aller Sorten wurde der gleiche Einfluss durch Stickstoffdüngung ausgeübt. Die Rutingealte in den Blättern aller Sorten waren bei den Freilandversuchen ohne Stickstoffdüngung signifikant höher als in den Blättern, die mit 120 kg Stickstoff pro ha gedüngt wurden.

Die Ergebnisse der sortentypischen Quercetingehaltsbestimmungen in den Blättern sind in Abb. 12 dargestellt.

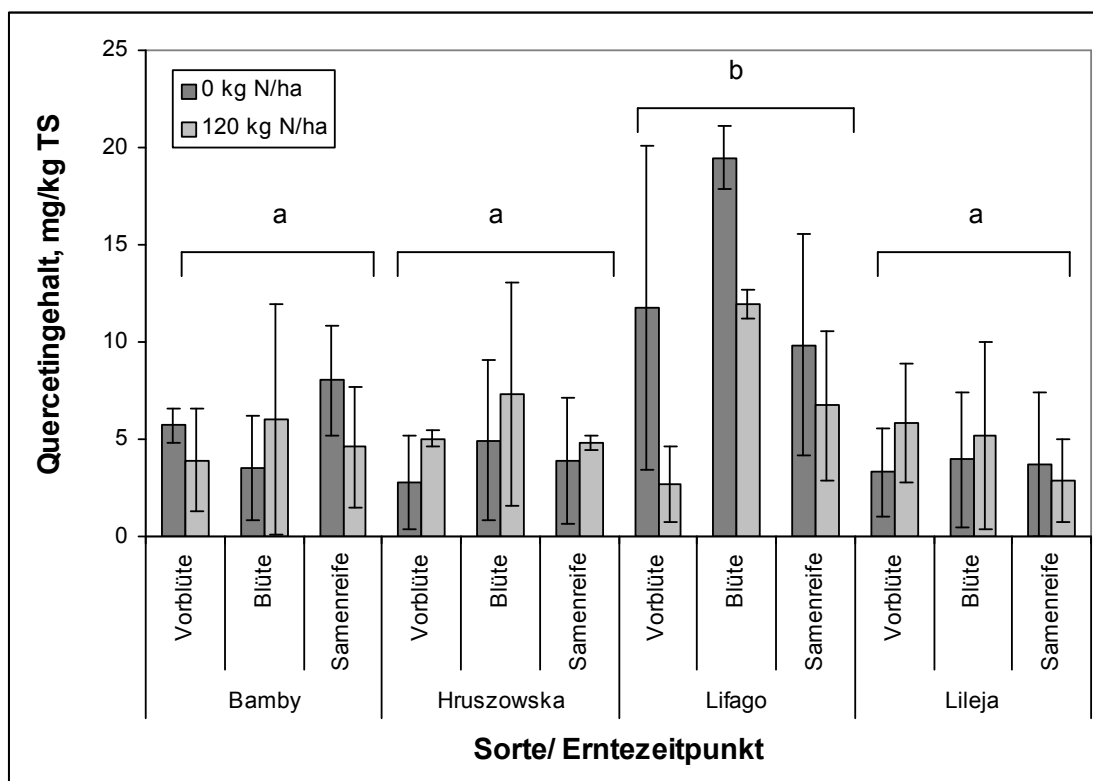


Abb. 12: Quercetingehalte in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten zu verschiedenen Erntezeitpunkten

Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Sorten mit gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant ( $p < 0,05$ )  $n = 4$

Die Quercetingehalte betrugen im Mittel der jeweiligen Erntezeitpunkte für die Sorte Bamby rund 5,2 mg/kg TS ohne und 5,0 mg/kg mit Stickstoffdüngung von 120 kg N/ha. Entsprechend wurden bei der Sorte Hruszowska Rutingehalte von 3,8 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 6,0 mg/kg TS (mit Düngung) ermittelt. Die Sorte Lifago besaß im Mittel Rutingehalte von 12,7 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 6,2 mg/kg TS (mit Düngung). Bei der Sorte Lileja waren dies 3,7 mg/kg TS (ohne Düngung) bzw. 4,5 mg/kg TS (mit Düngung).

Die geplanten Kontraste der univariaten Varianzanalyse ergaben hier signifikant höhere Quercetingehalte in den Blättern der Tatarischen Buchweizensorte Lifago als jeweils in den Blättern jeder übrigen Sorte des Echten Buchweizens ( $p < 0,001$ ). Beim post-hoc Test ließen sich keine weiteren signifikanten Sortenunterschiede ermitteln.

Das Ergebnis der Varianzanalyse nach 2.4 hinsichtlich des Einflusses des Erntezeitpunkts auf den Quercetingehalt der Blätter ist in Abb. 13 als Profildiagramm dargestellt.

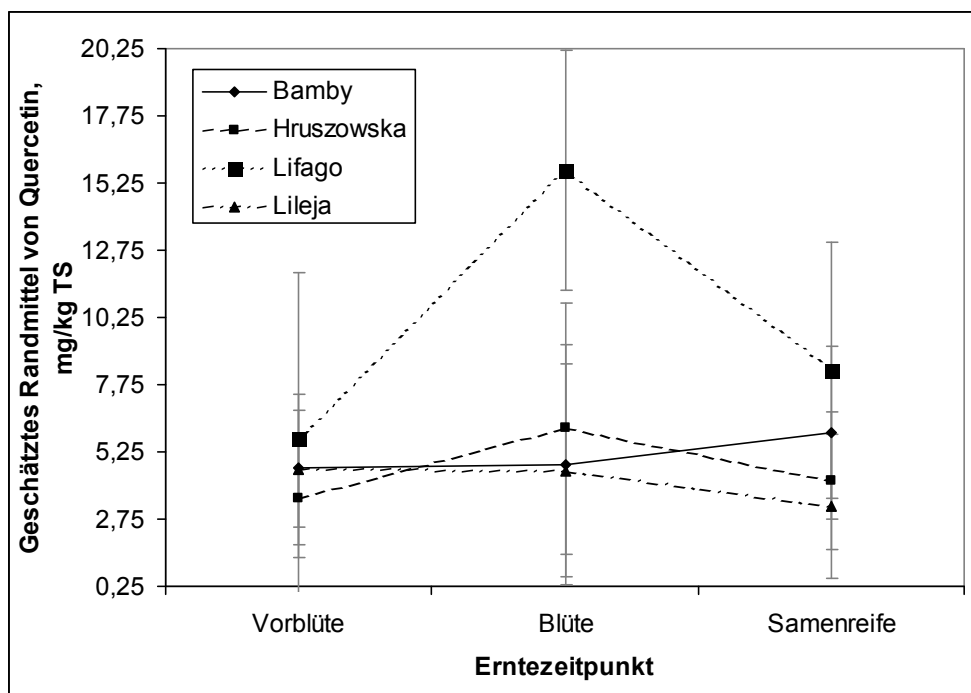


Abb. 13: Einfluss des Erntezeitpunkts auf den mittleren Quercetingehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig von der Düngung), gemäß dem Profildiagramm nach Varianzanalyse

Geschätztes Randmittel aus der deskriptiven Statistik, Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Signifikanz bei  $p < 0,05$ ,  $n = 8$

Der Haupteffekt für „Erntezeitpunkt“ erreichte bei den mittleren Quercetingehalten in Blättern Signifikanz ( $p = 0,023$ ), jedoch nicht die Interaktion aus „Erntezeitpunkt“ und „Sorte“. Auf die Quercetingehalte aller Sorten wurde durch den Erntezeitpunkt der gleiche Einfluss geübt.

Das Ergebnis der Varianzanalyse hinsichtlich des Einflusses der Stickstoffdüngung auf den Quercetingehalt der Blätter ist in Abb. 14 als Profildiagramm dargestellt.

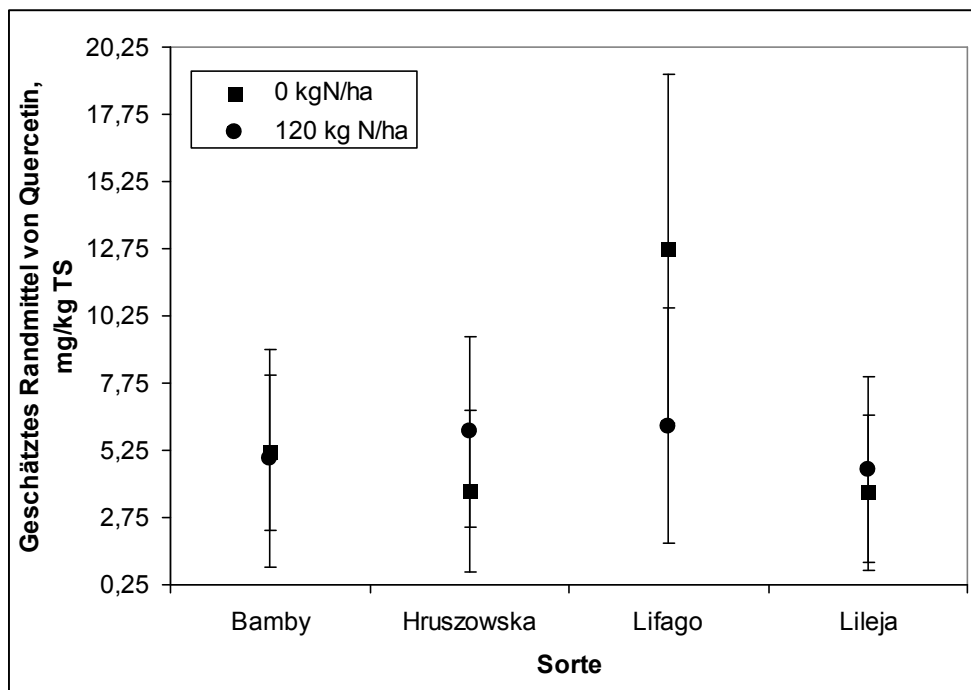


Abb. 14: Einfluss der Stickstoffdüngung auf den mittleren Quercetiningehalt in mg/kg TS in Buchweizenblättern verschiedener Sorten (unabhängig vom Erntezeitpunkt), gemäß dem Profildigramm nach Varianzanalyse

Geschätztes Randmittel aus der deskriptiven Statistik, Fehlerindikatoren stellen die Standardabweichung dar, Signifikanz bei  $p < 0,05$ ,  $n = 12$

Der Haupteffekt für „Düngung“ erreichte für die mittleren Quercetiningehalte keine Signifikanz, jedoch die Interaktion aus „Düngung“ und „Sorte“ ( $p = 0,011$ ). Hinsichtlich der Quercetiningehalte bestand ein unterschiedlicher Einfluss der Stickstoffdüngung auf die verschiedenen Sorten. Das Profildigramm mit geschätzten Randmitteln der Quercetiningehalte aus der Varianzanalyse (siehe Abb. 14) deutet an, dass sich die Quercetiningehalte in den Blättern der Sorte Bamby und Lileja scheinbar unwesentlich mit und ohne Stickstoffdüngung unterscheiden. Eine Stickstoffdüngung scheint bei den Blättern der Sorte Lifago den höchsten Einfluss zu haben und sich negativ auf die Quercetiningehalte auszuüben.

#### 3.1.4 Rutin und Quercetin in Samen und Schale von Tatarischem Buchweizen der Sorte Lifago

Die Gehalte des in Buchweizen dominierenden Flavonols Rutin und sein Aglykon Quercetin, wurden in den Fraktionen von Buchweizensamen der tatarischen Sorte Lifago ermittelt (siehe Tab. 5). Die Samen sind dazu geschält und gleichzeitig in die Fraktionen Samen (ohne Scha-



le) und Schale separiert worden (siehe 2.2.1). Anschließend erfolgte an den gemahlenen Fraktionen (siehe 2.2.2) die Probenaufbereitung nach 2.2.4 und die Gehaltsbestimmung mittels HPLC nach 2.2.5.

Tab. 5: Vergleich der Rutin- und Quercetingehalte in mg/kg TS in Samen und Schale von Buchweizensamen der Sorte Lifago

n = 3 (unabhängige Triplets, die wiederum aus den Mittelwerten einer Doppelbestimmung stammen), Fehler angegeben als Standardabweichung

Material	Gehalte, mg/kg TS	
	Rutin	Quercetin
Samen	99,9 ± 4,3	0,7 ± 0,37
Schale	28,0 ± 9,6	0,1 ± 0,02

Es wurden viermal höhere Rutingehalte in geschälten Samen gegenüber den Gehalten in der Schale ermittelt. Die Quercetingehalte sind jeweils kleiner als 1 mg/kg. Zu berücksichtigen ist die Tatsache, dass durch die Heterogenität der Samen in Form und Größe der Schälprozess nicht optimal vollzogen werden konnte. In Folge waren die Schalenfraktionen mit Samenmaterial belastet, was zu einem Fehler bei der Gehaltsbestimmung in den Fraktionen geführt haben müsste. Man kann also davon ausgehen, dass im Besonderen die Rutingehalte in der Schale tatsächlich niedriger als 25 mg/kg waren und dass die Flavonole hauptsächlich im Samen lokalisiert wurden.

### 3.2 Stabilität von Rutin und Quercetin im Modellbuchweizenteig gegenüber verschiedenen Temperaturen

#### 3.2.1 Beobachtung des enzymatischen Abbaus von Rutin zu Quercetin während des Anteigens bzw. im wässrigen System

Die im Tatarischen Buchweizen und somit auch in der Sorte Lifago u.a. im Samen vorkommende Flavonol-3-glykosidase hydrolysiert Rutin unter Bildung dessen Aglykons Quercetin und dem Disaccharid Rutinose. Das Enzym wird aktiv nach Zerstörung der Zellstruktur, also auch nach dem Mahlen des Samenmaterials. Die Aktivität lässt sich besonders gut im wässrigen System beobachten und übt entsprechend einen Einfluss auf die Gehalte an Rutin und

Quercetin vor allem während des Anteigens und Quellens aus. Dieser und eventuelle weitere Einflüsse auf die Stabilität von Rutin und Quercetin im wässrigen System wurden durch die Methode 2.2.8.1 beobachtet und in Abb. 15 dargestellt.

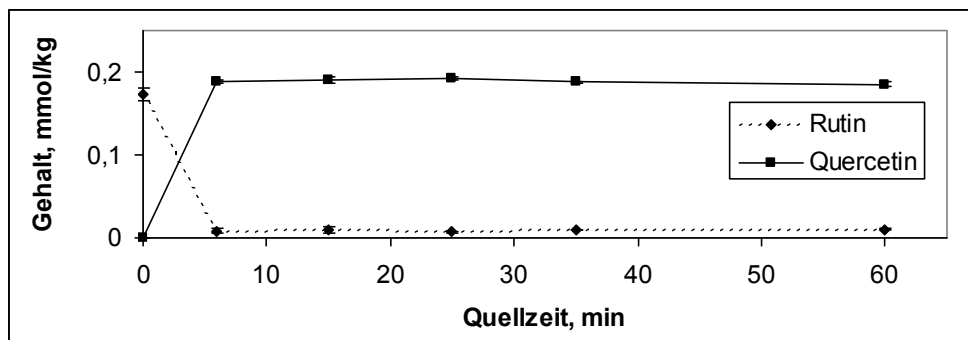


Abb. 15: Beobachtung der Rutin- und Quercetiningehalte in mmol/kg in Buchweizenteig. Gehalte bezogen auf die Mehleinwaage; 1 Massenanteil Mehl (Sorte Lifago, ungeschält) mit 2 Massenanteilen Wasser; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$

Es ist zu sehen, dass innerhalb von 6 min Rutin annähernd äquimolar zu Quercetin umgesetzt wurde. In der übrigen Quellzeit kam es zu keiner weiteren Veränderung in den Flavonolgehalten. Es sei angemerkt, dass der Rutiningehalt zum Zeitpunkt 0 nicht im Teig nach Methode 2.2.8.1 bestimmt wurde, sondern direkt nach 2.2.4. Man kann aus praktischen Gründen in den Ansätzen nach 2.2.8.1 keine eindeutige Messung des Rutiningehalts durchführen, da dieses sofort durch die Flavonol-3-glucosidase zu Quercetin hydrolysiert werden würde (Yasuda & Nakagawa, 1994) (vgl. 1.1.4). Das bedeutet, die Proben zum Zeitpunkt 0 wurden direkt mit 100 % Methanol zur Extraktion der Flavonole behandelt, die angeteigten Proben dagegen mit einem methodisch bedingten resultierenden Methanolgehalt von rund 90 %. Daher kann man davon ausgehen, dass die beobachteten höheren molaren Anteile an Quercetin gegenüber Rutin nach 6 min und darüber hinaus aus den differierenden Löslichkeiten des Rutins in den untersuchten Systemen und der dadurch erleichterten enzymatisch katalysierten Hydrolyse rührten (vgl. Anmerkung bei 2.2.4). Das heißt, dass man auf einen äquimolaren Umsatz von Rutin zu Quercetin schließen kann.

### 3.2.2 Rutin- und Quercetingehalte im Mehl in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit

Eine Einschätzung der Stabilität von Rutin und Quercetin im Teig aus Lifago-Mehl unter dem Einfluss hoher Temperaturen konnte nach Durchführung der Methode 2.2.8 erfolgen. Es wurden die Temperaturen 150, 200 und 250 °C gewählt, um einen Backprozess zu simulieren. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 und Abb. 17 dargestellt. Gezeigt ist die jeweilige Abhängigkeit der Rutin- bzw. Quercetingehalte von verbackenem Teig bezogen auf dessen Mehlgelhalt gegenüber den gewählten Temperaturen.

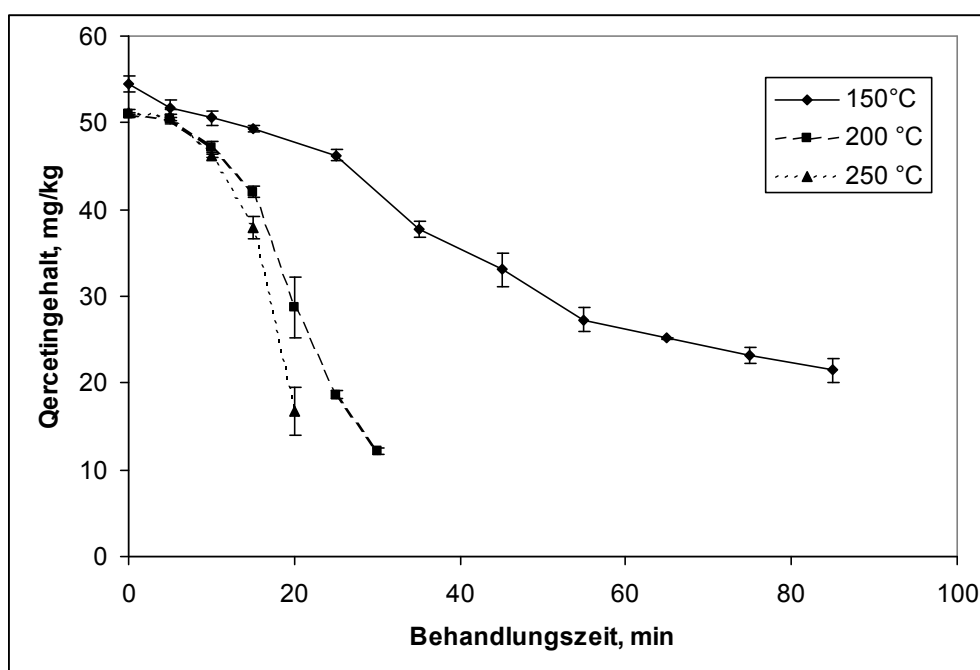


Abb. 16: Einfluss der Behandlungsdauer im Konvektomat bei 150, 200 und 250 °C auf den Quercetingehalt in mg/kg im verbackenen Buchweizenteig  
Gehalte bezogen auf die Mehleinwaage; 1 Massenanteil Mehl (Sorte Lifago, ungeschält) mit 2 Massenanteilen Wasser, 1 h Quellzeit; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$

Man sieht die jeweils stete Abnahme von Quercetin, dem im Lifago-Mehl nach Anteigen gegenüber Rutin dominierenden Flavonol. Eine Abnahme um 50 % war bei 150 °C nach ca. 55 min, bei 200 °C nach ca. 23 min und bei 250 °C nach ca. 18 min erfolgt. Die Geschwindigkeit der Abnahme hat erwartungsgemäß mit steigender Temperatur zugenommen, wobei der Kurvenverlauf bei 200 °C sich dem bei 250 °C stärker annähert als dem bei 150 °C. Die

relativ langsame Abnahme des Quercetins bei 150 °C lässt eine leichtere Kontrolle der Behandlung im Konvektomat hinsichtlich des Erhalts von Rutin zu.

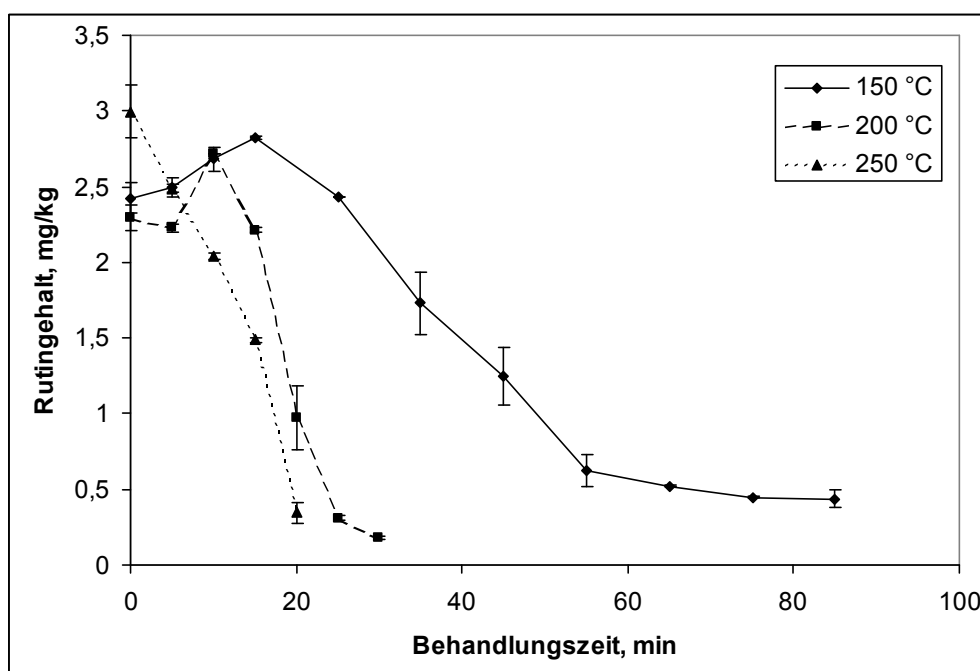


Abb. 17: Einfluss der Behandlungsdauer im Konvektomat bei 150, 200 und 250 °C auf den Rutingehalt in mg/kg im verbackenen Buchweizenteig  
Gehalte bezogen auf die Mehleinwaage; 1 Massenanteil Mehl (Sorte Lifago, ungeschält) mit 2 Massenanteilen Wasser, 1 h Quellzeit; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$

In Abb. 17 wird eine Abnahme von Rutin in vergleichbarer Weise, zu der oben für Quercetin beschriebenen, deutlich. Hier sind allerdings die Ordinatenwerte ca. 20 mal kleiner und die Abnahme schreitet bis zur nahezu kompletten Degradation voran. Eine Abnahme um 50 % erfolgte hier bei 150 °C nach ca. 45 min, bei 200 °C nach ca. 20 min und bei 250 °C nach ca. 15 min. Der leichte Anstieg des Rutingehalts bei 150 und 200 °C ist vernachlässigbar und rührt wahrscheinlich überwiegend aus der Zeitspanne, die das matrixgebundene Rutin benötigt, um in Lösung zu gehen. Scheinbar ist das nicht-kovalent gebundene Rutin an die Zellwandstruktur zu großen Teilen über seinen Disaccharidrest koordiniert (siehe 2.2.4, vgl. Argumentation aus 3.2.1). Folglich ist ein entsprechender Anstieg bei Quercetin nicht beobachtbar, da dieses Hydrolyseprodukt der durch die Flavonol-3-glucosidase katalysierten Reaktion, direkt in Lösung gehen kann. Ansonsten entspricht das Ergebnis dem von Quercetin unter Temperatureinfluss (siehe Abb. 16).

### 3.2.3 Rutin- und Quercetingehalte im Mehl in Abhängigkeit vom Wassergehalt bei verschiedenen Temperaturen

Die Messergebnisse aus dem Versuch nach 2.2.8 wurden weiterhin auf den zum Zeitpunkt der Probennahme in den Proben enthaltenen Wassergehalt bezogen. Dies ermöglichte eine zusätzlich Aussage zu der über die Stabilität Quercetin und Rutin in Abhängigkeit von Temperatur und Zeit. Der Wassergehalt diente hier als Korrelat zum Flavonolgehalt. Somit konnte neben der Annäherung an eine optimale Backzeit- und -temperatur auch eine Zuordnung zu einem potentiell angestrebten Produkt über dessen spezifischen Wassergehalt erfolgen (siehe 4.2). In Abb. 19 und Abb. 18. wurden also Quercetin- bzw. Rutinkonzentrationen zu denselben Zeitpunkten gegen die prozentualen, rechnerisch ermittelten Wassergehalte der Teiglinge aufgetragen. Der theoretische Endpunkt der Behandlungsdauer wurde hier allerdings nicht entsprechend der zu starken Bräunung der verbackenen Teige (vgl. 2.2.8) gewählt, sondern bevor der theoretische Moment, an dem der rechnerisch ermittelte Wassergehalt unter 0 % sinkt, eingetreten wäre.

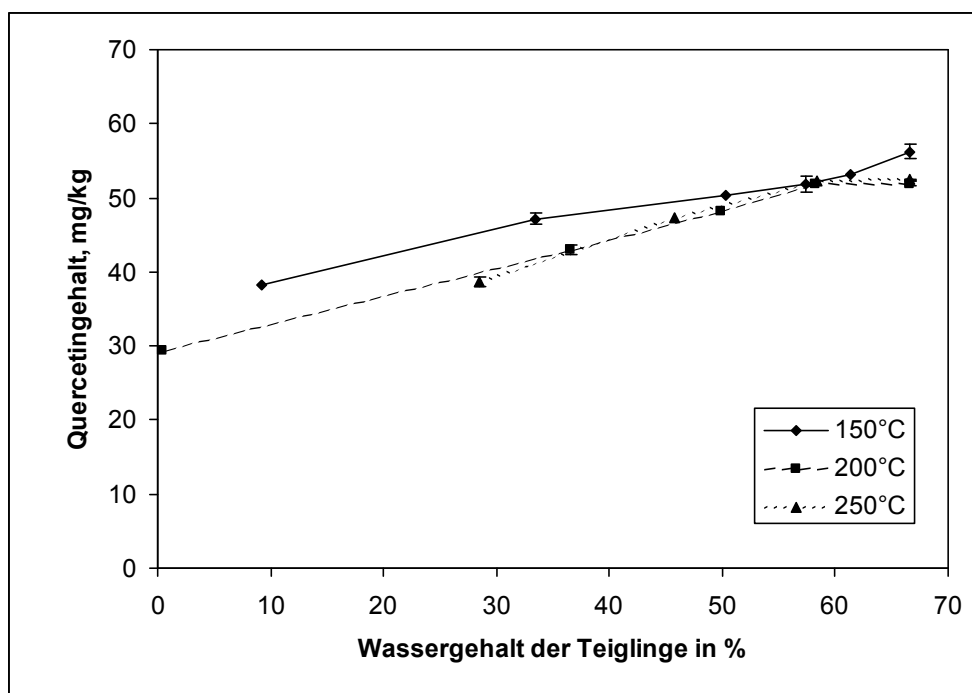


Abb. 18: Quercetingehalt in mg/kg Mehl in verbackenem Buchweizenteig in Abhängigkeit vom sinkenden Wassergehalt in % im Verlauf des Prozesses

1 Massenanteil Mehl (Sorte Lifago, ungeschält) mit 2 Massenanteilen Wasser, 1 h Quellzeit; Behandlung im Konvektomat bei 150, 200 und 250 °C; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar, n = 2

Die Ableitungen aus den Beobachtungen beider Graphiken entsprechen weitestgehend denen aus 3.2.2. Umgekehrt proportional zur voranschreitenden Behandlungsdauer verhält sich hier der Quercetingehalt auch gegenüber abnehmenden Wassergehalt der Proben. Beobachtet man vor allem den Kurvenverlauf bei 150 °C, sieht man, dass bei der um rund die Hälfte vorangeschrittenen Behandlungsdauer eine Abnahme der Konzentration an Quercetin von ca. 56 mg/kg bis ca. 47 mg/kg erfolgt war. Dies entspricht einer Abnahme um ca. 16 % bei einem Wassergehalt von ca. 35 %. Bei 200 und 250 °C ist dies bei einem Wassergehalt von ca. 40 % der Fall.

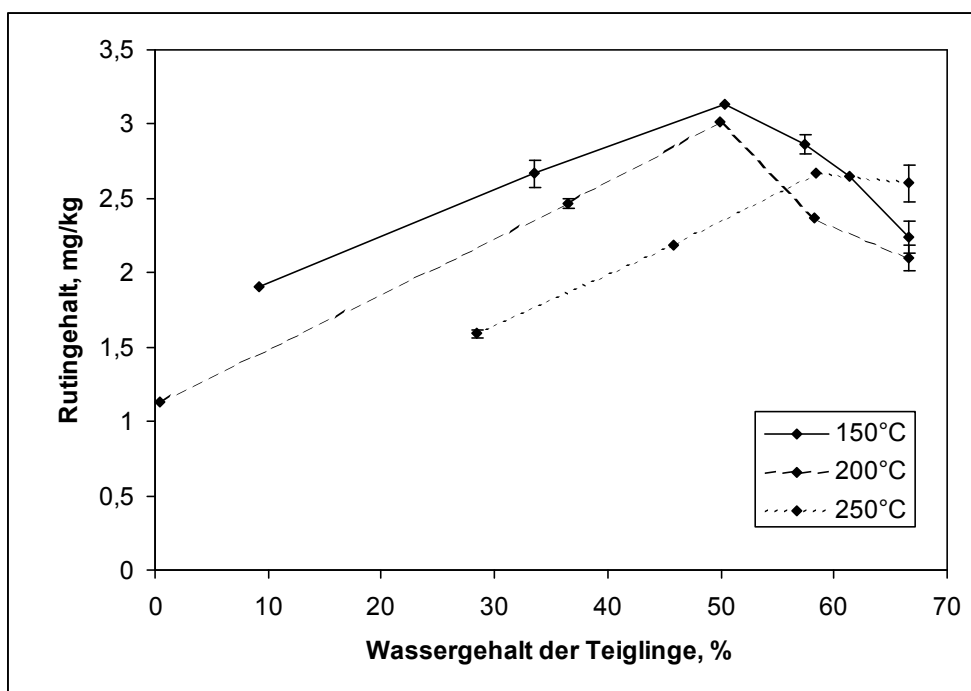


Abb. 19: Rutiningehalt in mg/kg Mehl in verbackenem Buchweizenteig in Abhängigkeit vom sinkenden Wassergehalt in % im Verlauf des Prozesses

1 Massenanteil Mehl (Sorte Lifago, ungeschält) mit 2 Massenanteilen Wasser, 1 h Quellzeit; Behandlung im Konvektomat bei 150, 200 und 250 °C; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$

Hier lässt sich ein ähnliches Ergebnis bei der um die Hälfte abgelaufenen Behandlungsdauer über die Abnahme der Rutinkonzentration für die Behandlung bei 250 °C ableiten. Der Wassergehalt liegt hier ebenfalls bei rund 40 %. Für die Behandlung bei den Temperaturen 150 und 200 °C ist eine Aussage über die Abnahmen der Konzentration des hier in Spuren (siehe Anhang I., Legende zur Tabelle) vorkommenden Rutins aufgrund der höheren Messungenauigkeiten am Anfang der Behandlung nur schwer möglich.

### 3.3 Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase

#### 3.3.1 Nasschemische Methoden

Nach 2.2.9.1 erfolgten Versuche zur nasschemischen Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase (F3g) mit diversen methanolischen Lösungen und variierenden pH-Werten. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.

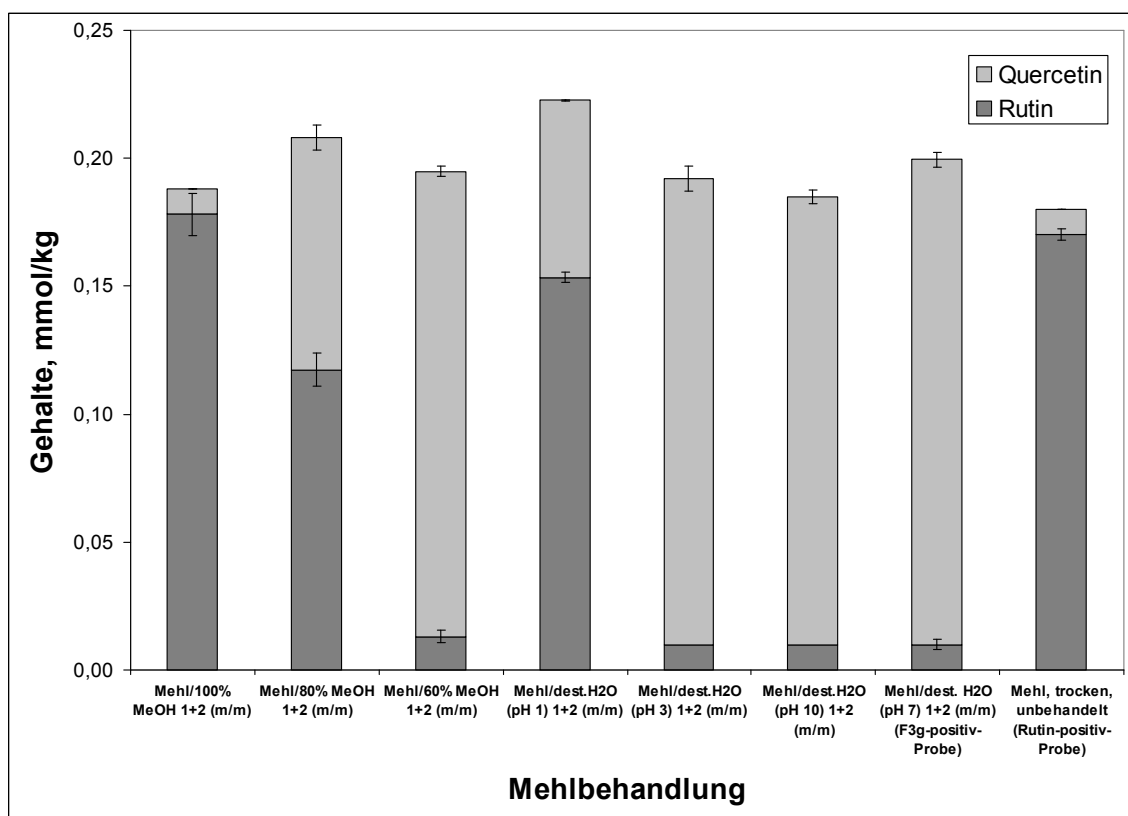


Abb. 20: Nasschemische Versuche zur Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase  
Versetzen mit 100, 80 und 60 % (v/v) Methanol und bei pH 1, 3, 7 (F3g-positiv-Probe) und 10 im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe (Mehl, trocken, unbehandelt); 1 Massenanteil Mehl (Sorte Lifago, ungeschält) mit 2 Massenanteilen Wasser (m/m); Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar, n = 2; für die Rutin- bzw. Quercetiningehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze wurde entsprechend der theoretische Gehalte von  $\leq 0,01$  mmol/kg eingesetzt

Qualitativ sieht man deutlich, dass weder 60 % Methanol, noch ein pH von 3 oder 10 die Flavonol-3-glykosidase inaktiviert haben. Die Proben verhielten sich wie die F3g-positiv-Probe und bauten das Rutin nahezu vollständig zu Quercetin äquimolar ab. Bei Zugabe von 80 % (v/v) sowie bei pH 1 zeigte sich teilweise eine Inaktivierung der F3g durch einen deutlichen Unterschied zur F3g-positiv-Probe. Diese betrug bei Zugabe von 80 % Methanol ca. 47 %

und bei pH 1 ca. 37 % bezogen auf die gebildete Menge Quercetin in der F3g-positiv-Probe. Eine vollständige Inaktivierung trat dagegen nur bei Zugabe von 100 % (v/v) Methanol ein, wobei sich die Probe wie die Rutin-positiv-Probe verhielt.

### 3.3.2 Inaktivierung durch Mikrowellenbehandlung

Eine mögliche Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase durch Mikrowellenbehandlung wurde nach 2.2.9.2 getestet. Diese Behandlung diente primär dem Zweck, die enzymatisch katalysierte Hydrolyse von Rutin zu verhindern. Die Ergebnisse hierzu zeigt Abb. 21.

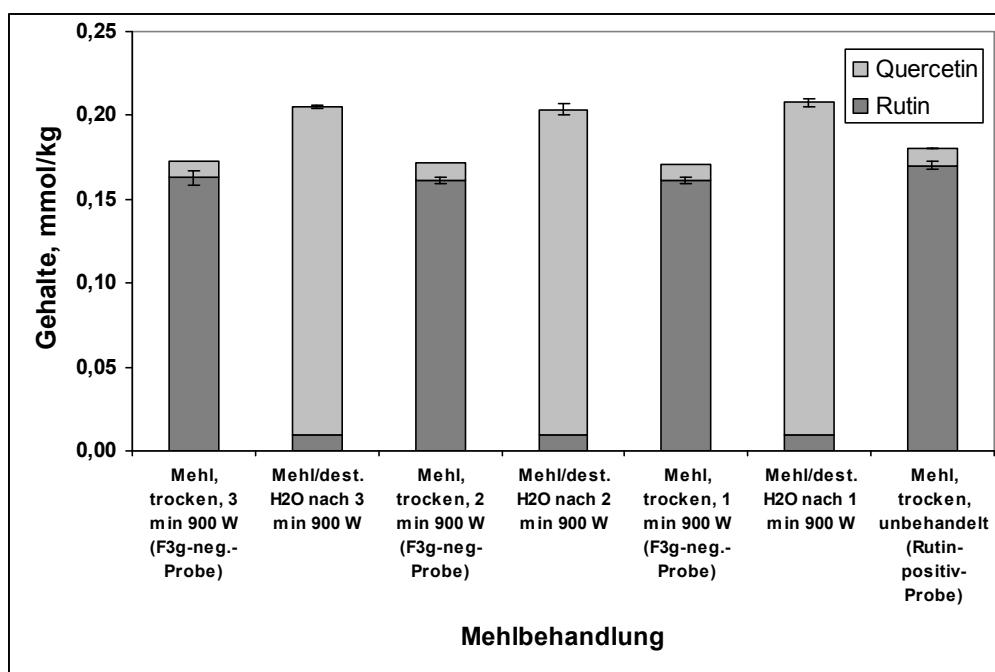


Abb. 21: Einfluss von Mikrowellenbehandlungen auf die F3g-Aktivität in Lifago-Mehl. Behandlung für 1, 2 und 3 min bei 900 W mit und ohne (F3g-negativ-Probe) anschließender Wasserzugabe im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe (Mehl, trocken, unbehandelt); 1 Massenanteil Mehl (von ungeschälten Samen) mit 2 Massenanteilen Wasser (*m/m*); Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$ ; für die Rutin- bzw. Quercetingehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze wurde entsprechend der theoretische Gehalt von  $\leq 0,01$  mmol/kg eingesetzt.

Man sieht deutlich die erfolgte Umsetzung von Rutin zu Quercetin in den mit Wasser versetzten Proben, während die F3g-negativ-Proben im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe keinen relevanten Unterschied zeigen. Die Flavonol-3-glucosidase wurde also durch die Mikrowellenbehandlung nicht inaktiviert.



### 3.3.3 Inaktivierung durch Hitzebehandlung

Die Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase durch Hitzebehandlung wurde gemäß 2.2.9.3 durchgeführt. Diese Behandlung diente ebenfalls primär dem Zweck, den enzymatischen Abbau von Rutin zu verhindern. Weiterhin sollte die laut Literatur (Suzuki et al., 2004) etablierte Methode hinsichtlich ihrer qualitativen Anwendbarkeit für die Zwecke dieser Arbeit geprüft werden. Abb. 22 stellt das Ergebnis dar.

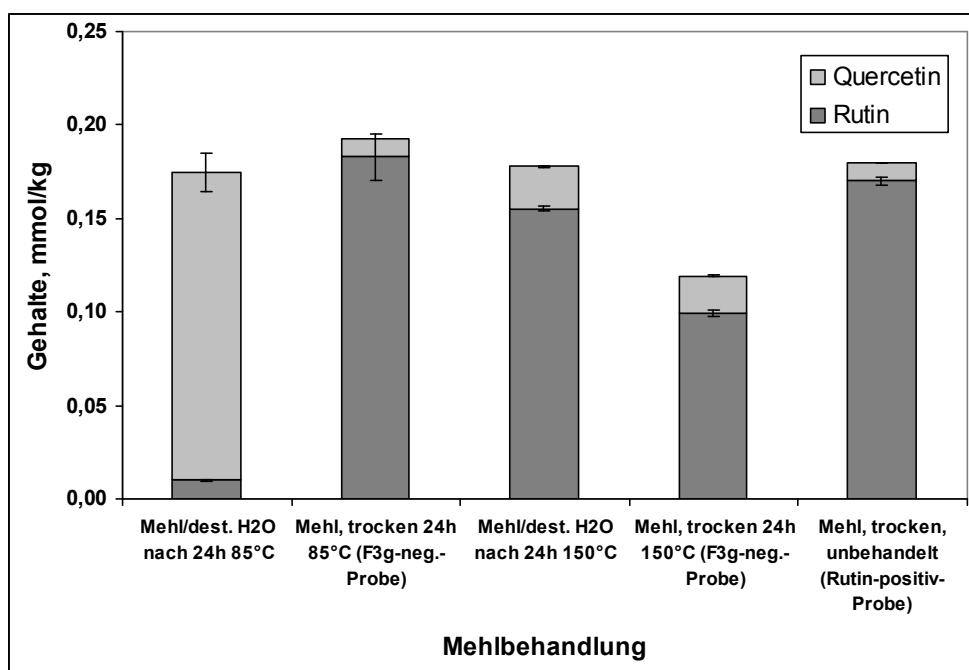


Abb. 22: Einfluss zweier Hitzebehandlungen auf die F3g-Aktivität in Lifago-Mehl  
Behandlung für 24 h bei 85 °C und 24 h bei 150 °C mit und ohne (F3g-negativ-Probe) anschließender Wasserzugabe im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe (Mehl, trocken, unbehandelt); 1 Massenanteil Mehl (von ungeschälten Samen) mit 2 Massenanteilen Wasser (*m/m*); Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar, *n* = 2; für die Rutin- bzw. Quercetiningehalte unterhalb der Bestimmungsgrenze wurde entsprechend der theoretische Gehalt von  $\leq 0,01$  mmol/kg eingesetzt

Die bei 85°C für 24 h behandelte Probe zeigte nach Versetzen mit Wasser qualitativ einen deutlichen Unterschied zur F3g-negativ-Probe, während diese im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe keinen relevanten Unterschied aufwies. In diesem Fall hat also keine Inaktivierung der Flavonol-3-glykosidase stattgefunden. Allerdings konnte man festhalten, dass der Rutingehalt im Mehl bei 85 °C für 24 h im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe keine quantitative Veränderung erfuhr. Rutin scheint unter diesen Bedingungen relative stabil zu sein. (Allerdings sei bezüglich quantitativer Aussagen darauf hingewiesen, dass sich die Gehalte im Ultraschallbe-

reich und nahe der Bestimmungsgrenze befanden.) Die Methode nach (Suzuki et al., 2004) konnte jedoch nicht reproduziert werden. Die bei 150 °C für 24 h behandelte Probe hat keinen qualitativen Unterschied zur F3g-negativ-Probe und auch zur Rutin-positiv-Probe aufgewiesen. Da in besagten Proben keine relevante Zunahme an Quercetin zu verzeichnen war, kann man schließen, dass das Enzym inaktiviert wurde. Vergleicht man den Rutingehalt des trockenen Mehls nach 24 h bei 150 °C mit dem der Rutin-positiv-Probe, erfuhr der Gehalt eine Minderung von rund 40 %. Das mit Wasser versetzte Mehl nach 24 h bei 150 °C zeigte keine wesentliche Rutinabnahme. Vergleicht man diese beiden Proben, ist die Begründung in der Löslichkeit von Rutin in Methanol bzw. einem Methanol-Wasser-Gemisch und der daraus resultierenden Verfügbarkeit als Substrat (vgl. hierzu die Argumentation zu 3.2.1.). Man könnte vermuten, das mit Wasser versetzte Mehl nach 24 h bei 85 °C hätte ebenso gegenüber dem trockenen Mehl eine höhere Summe der Rutin- und Quercetiningehalte aufweisen müssen. Betrachtet man bei diesen beiden Proben die Standardabweichung, ist dies auch tatsächlich möglich und wird somit angenommen. Für die qualitative Aussage, bleibt jedoch weiterhin festzuhalten, dass die Flavonol-3-glucosidase im Mehl im Anschluss der Behandlung nach 24 h bei 150 °C nach Versetzen mit Wasser keine Aktivität zeigte.

### 3.3.3.1 Viskosität des Teigs

Die Viskosität des Teiges aus Lifago-Mehl erlaubte eine vergleichende Einschätzung der Backeigenschaften vor und nach Hitzebehandlung bei 150 °C für 24 h. Das Mehl wurde aus geschälten Lifago-Samen aus dem Jahr 2007 gefertigt. Die Viskositäten wurden nach der Methode in 2.2.8.2 ermittelt. Das Ergebnis gibt Tab. 6 wieder.

Tab. 6: Viskosität von Lifago-Teig vor und nach Hitzebehandlung

Teigmaterial	Viskosität, mPa·s
Lifago-Mehl, unbehandelt	505 ± 5*
Lifago-Mehl, hitzebehandelt	n.b.†

\* mittlere Abweichung, n = 2

† nicht bestimmbar

Im hitzebehandelten Lifago-Mehl konnte nach Anteigen und 1 h Quellzeit keine konstante Viskosität gemessen werden. Das Mehl sank nach jedem Umrühren der Suspension als Sediment zu Boden.

### 3.4 Ansatz zur biochemischen Überführung von Rutin in Isoquercitrin

#### 3.4.1 Wachstumskurven

Die Beobachtung der Milchsäurebakterien in statischen Kulturen gab Aufschluss über ihr Wachstum in MRS-Medien unterschiedlicher Zusammensetzung (siehe Abbildungen in 3.4.1.1 und 3.4.1.2). Im Folgenden sind Wachstumskurven aller *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämme dargestellt. Dafür sind die Kulturen wie in 2.3.3 beschrieben behandelt worden.

##### 3.4.1.1 *Lb. plantarum*

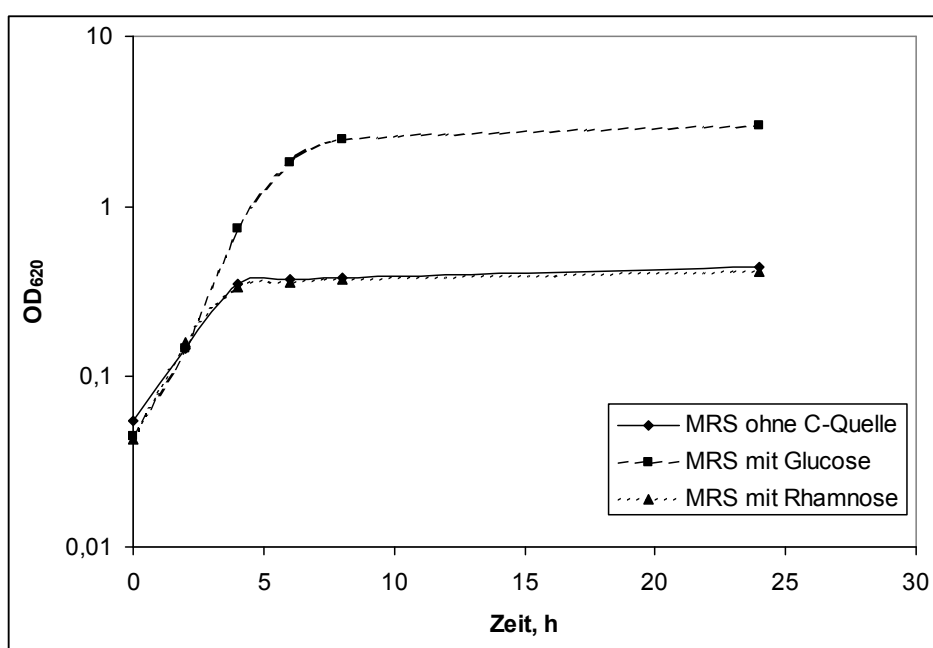
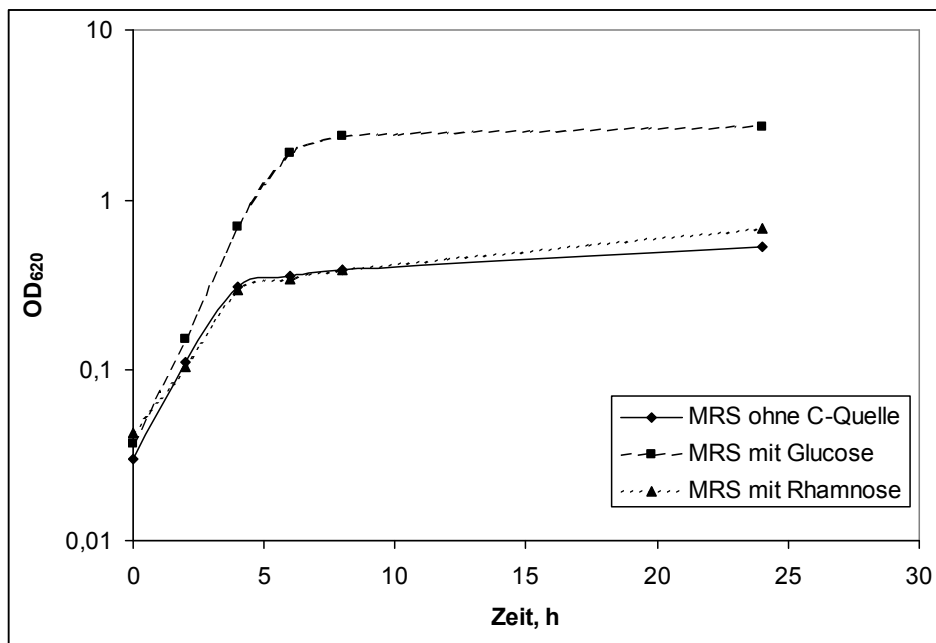
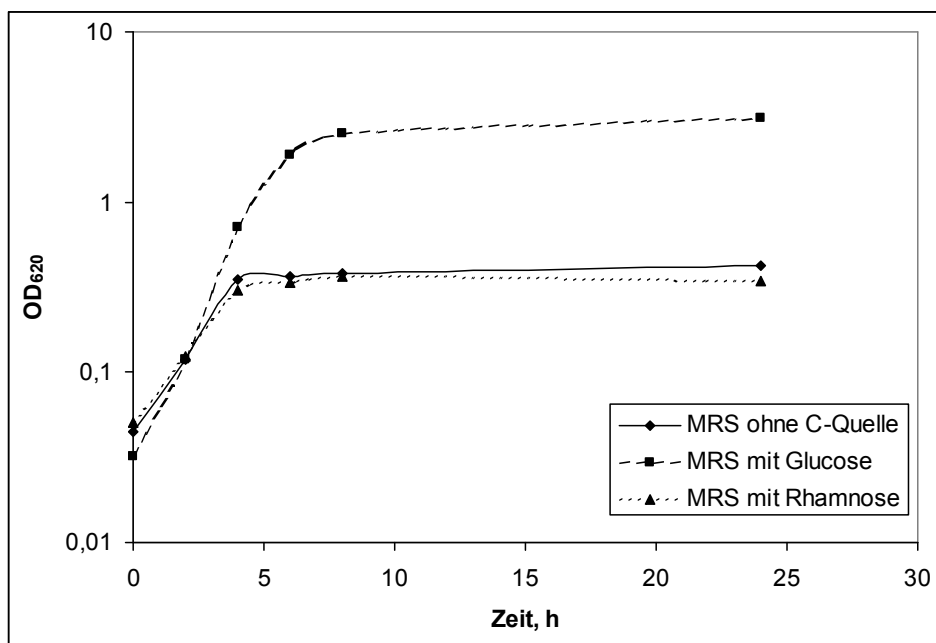


Abb. 23: Wachstumskurven von *Lb. plantarum* 92260

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5) ohne Kohlenstoffquelle, in MRS-Bouillon (pH 5,5) mit 2 % (*m/v*) D-(+)-Glucose und in MRS-Bouillon (pH 5,5) mit 2 % (*m/v*) L-(+)-Rhamnose;  $OD_{620}$  der Zellsuspensionen logarithmisch gegen die Zeit in h aufgetragen

Abb. 24: Wachstumskurven von *Lb. plantarum* 92265

Bedingungen siehe Abb. 23

Abb. 25: Wachstumskurven von *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6

Bedingungen siehe Abb. 23

Das Wachstum aller drei *Lb. plantarum*-Stämme (Abb. 23, Abb. 24, Abb. 25) verhielt sich sehr ähnlich. Keine der Wachstumskurve ließ eine Induktionsperiode oder lag-Phase erkennen. Die Wachstumskurven jedes Stammes in MRS-Bouillon mit 2 % (*m/v*) D-(+)-Glucose waren deutlich unterschiedlich zu denen der sowohl in MRS-Bouillon ohne Zucker als Koh-

lenstoffquelle als auch in MRS-Bouillon mit 2 % (*m/v*) L-(+)-Rhamnose kultivierten Stämme. Sie zeigten allesamt eine etwas längere log-Phase und eine höhere Zelldichte, also ein insgesamt besseres Wachstum. Die Wachstumskurven jedes Stammes in MRS-Bouillon ohne Zucker als Kohlenstoffquelle und in MRS-Bouillon mit 2 % (*m/v*) L-(+)-Rhamnose waren sich untereinander sehr ähnlich. Das bedeutet, dass L-(+)-Rhamnose als Wachstumsfaktor keinen positiven Einfluss auf die *Lb. plantarum*-Stämme zeigte. Diese Stämme haben die L-(+)-Rhamnose nicht verwerten können. Somit ist es unwahrscheinlich, dass einer dieser Stämme Rhamnosidaseaktivität besitzt.

#### 3.4.1.2 *Lb. rhamnosus*

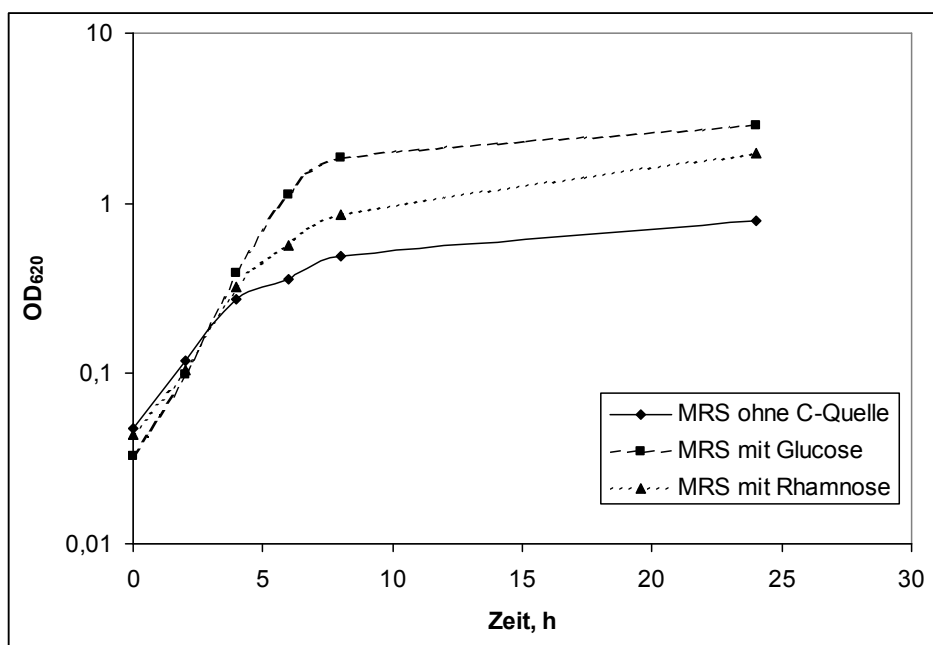


Abb. 26: Wachstumskurven von *Lb. rhamnosus* 92255

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5) ohne Kohlenstoffquelle, in MRS-Bouillon (pH 5,5) mit 2 % (*m/v*) D-(+)-Glucose und in MRS-Bouillon (pH 5,5) mit 2 % (*m/v*) L-(+)-Rhamnose;  $OD_{620}$  der Zellsuspensionen logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen

Die Wachstumskurve von *Lb. rhamnosus* 92255 in MRS-Bouillon mit D-(+)-Glucose (Abb. 26) zeigt die längste log-Phase und die höchste Wachstumsdichte gegenüber den Kulturen in den übrigen Medien. Wobei auch die Wachstumskurve des Stammes in MRS-Bouillon mit L-(+)-Rhamnose deutlich vom Wachstum in MRS-Bouillon ohne Zucker als Kohlenstoffquelle abgewichen ist. Eine lag-Phase war in allen drei Wachstumskurven nicht zu erkennen. Der

Stamm *Lb. rhamnosus* 92255 konnte scheinbar L-(+)-Rhamnose verwerten. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Stamm Rhamnosidaseaktivität besitzt.

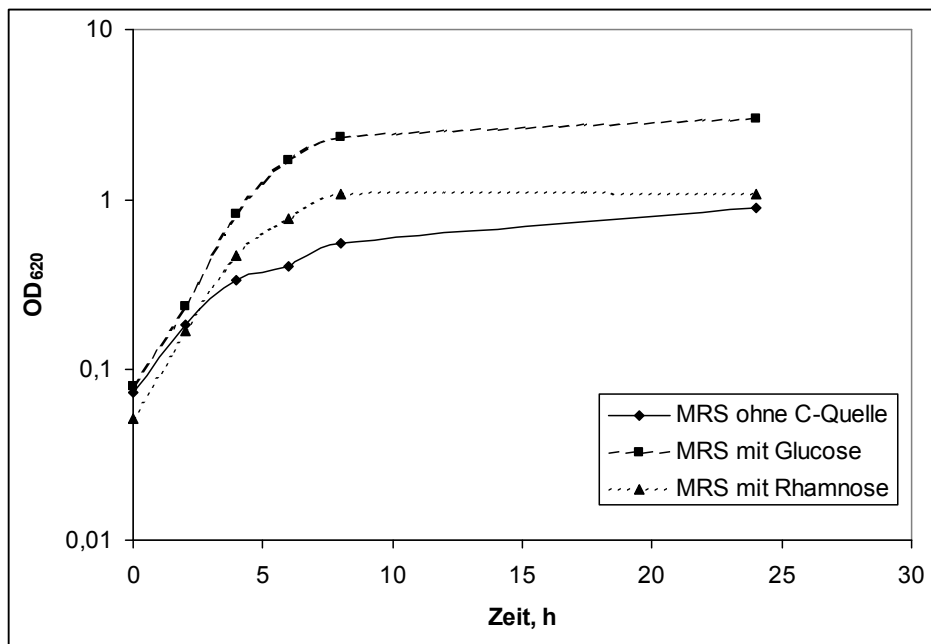


Abb. 27: Wachstumskurven von *Lb. rhamnosus* 92278

Bedingungen siehe Abb. 26

*Lb. rhamnosus* 92278 zeigte in MRS-Bouillon mit D-(+)-Glucose (Abb. 27) die längste log-Phase und die höchste Wachstumsdichte gegenüber den Kulturen in den übrigen Medien. Die Kurve der Kultivierung in MRS-Bouillon mit L-(+)-Rhamnose näherte sich während der stationären Phase nach 24 h wieder der mit Kulturen in MRS-Bouillon ohne L-(+)-Rhamnose aufgenommenen Kurve, an. Dieser Stamm hat die L-(+)-Rhamnose nicht verwerten können. Somit ist es unwahrscheinlich, dass der Stamm Rhamnosidaseaktivität besitzt. Es sei angemerkt, dass Kulturen dieses Stammes im Flüssigmedium eine leichte Klumpenbildung zeigten.

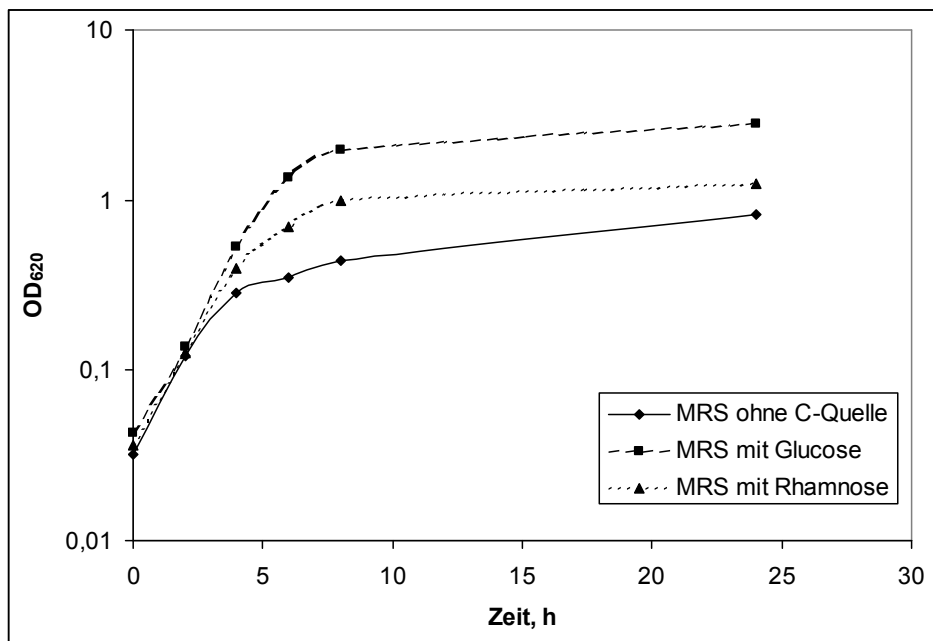
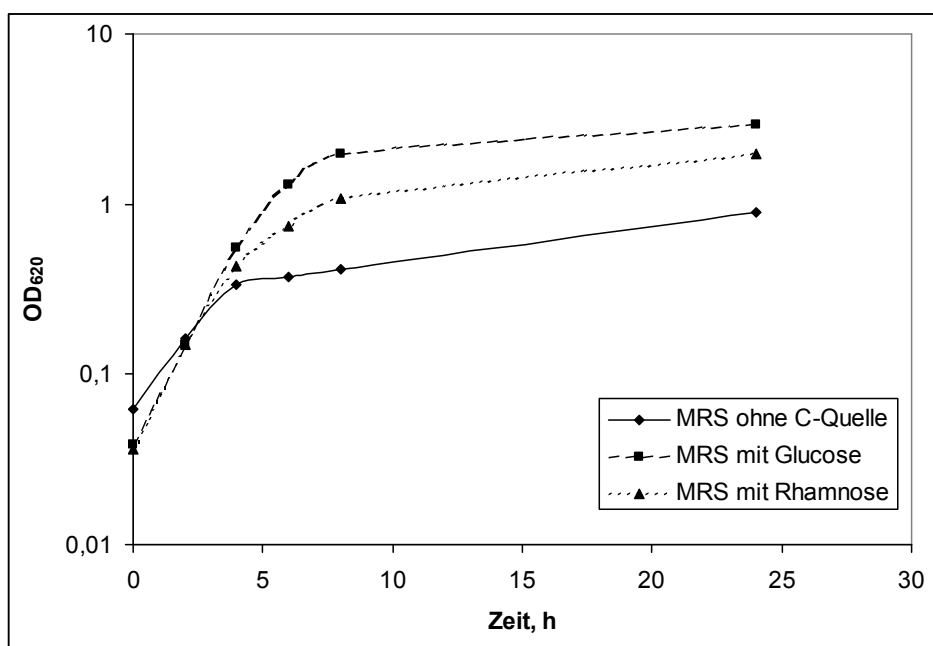


Abb. 28: Wachstumskurven von *Lb. rhamnosus* 92264

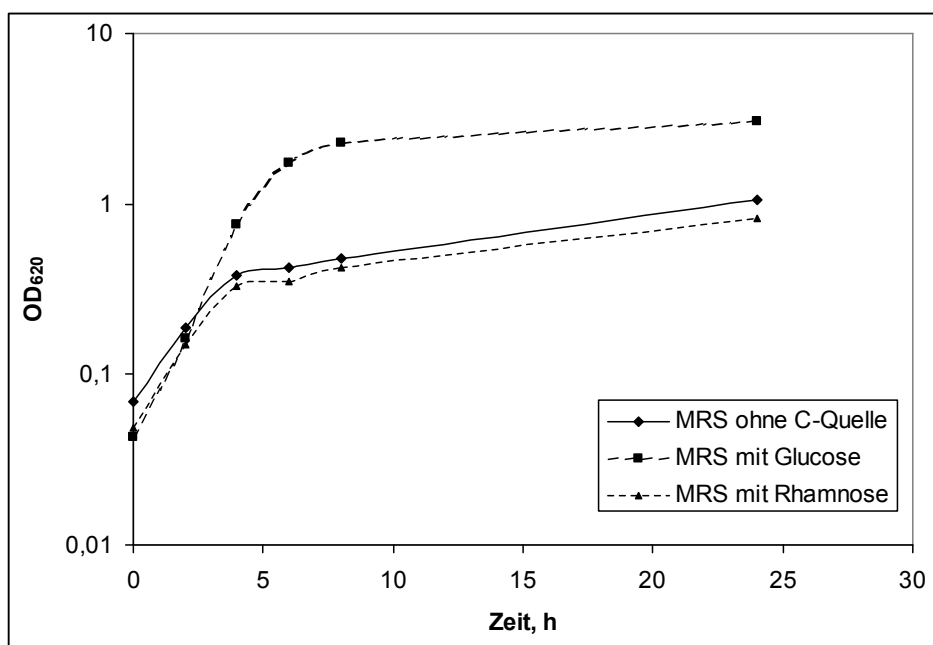
Bedingungen siehe Abb. 26

Bei *Lb. rhamnosus* 92264 (Abb. 28) zeigte sich der gleiche Sachverhalt wie bei *Lb. rhamnosus* 92278 (siehe oben). Somit hat L-(+)-Rhamnose als Wachstumsfaktor auch keinen positiven Einfluss auf *Lb. plantarum* 92264. Es ist unwahrscheinlich, dass der Stamm Rhamnosidaseaktivität besitzt. Kulturen dieses Stammes zeigten wie *Lb. rhamnosus* 92278 leichte Agglutination im Flüssigmedium.

Abb. 29: Wachstumskurven von *Lb. rhamnosus* 92034

Bedingungen siehe Abb. 26

Bei *Lb. rhamnosus* 92034 (Abb. 29) zeigte sich der gleiche Sachverhalt wie bei *Lb. rhamnosus* 92255 (siehe oben). D.h. der Stamm *Lb. rhamnosus* 92034 konnte L-(+)-Rhamnose verwerten. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Stamm Rhamnosidaseaktivität besitzt.

Abb. 30: Wachstumskurven von *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103)

Bedingungen siehe Abb. 26



Das Wachstum von *Lb. plantarum* GG (ATCC53103) (Abb. 30) in MRS-Bouillon mit D-(+)-Glucose war deutlich unterschiedlich von dem sowohl in MRS-Bouillon ohne Zucker als Kohlenstoffquelle als auch in MRS-Bouillon mit L-(+)-Rhamnose. Die Wachstumskurve zeigte eine etwas längere log-Phase und eine höhere Zelldichte, also ein insgesamt besseres Wachstum. Die Kurven des Stammes in MRS-Bouillon ohne Zucker als Kohlenstoffquelle und in MRS-Bouillon mit L-(+)-Rhamnose waren sich untereinander sehr ähnlich. Das bedeutet, dass L-(+)-Rhamnose als Wachstumsfaktor keinen positiven Einfluss auf *Lb. plantarum* GG (ATCC53103) hatte. Der Stamm hat L-(+)-Rhamnose nicht verwerten können. Somit ist es unwahrscheinlich, dass er Rhamnosidaseaktivität besitzt.

### 3.4.2 Einfluss von Ethanol auf das Zellwachstum

Die Überführung von Rutin zu Isoquercitrin setzte die Zugabe einer ethanolischen Rutinlösung zu den Fermentations- bzw. Inkubationsansätzen voraus. Daher wurde der Einfluss von Ethanol auf das Zellwachstum aller *Lb. plantarum*- sowie *Lb. rhamnosus*-Stämme getestet. Vorgegangen wurde nach 2.3.4. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen unter 3.4.2.1 und 3.4.2.2 dargestellt.

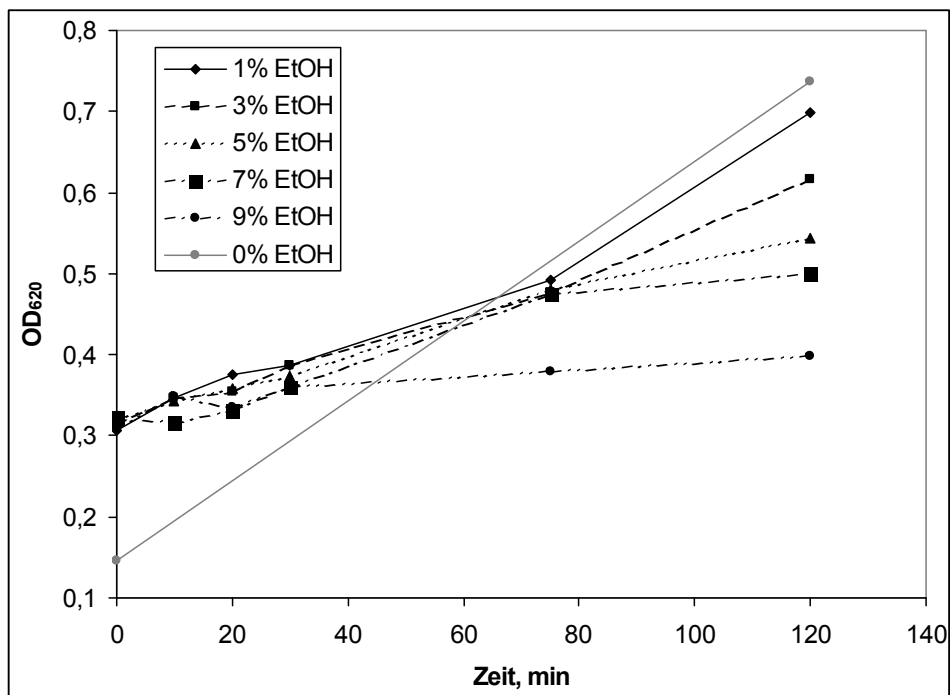
3.4.2.1 *Lb. plantarum*

Abb. 31: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. plantarum* 92260

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5); Vergleich mit einem Kurvenabschnitt aus Wachstumsversuchen mit 0 % EtOH

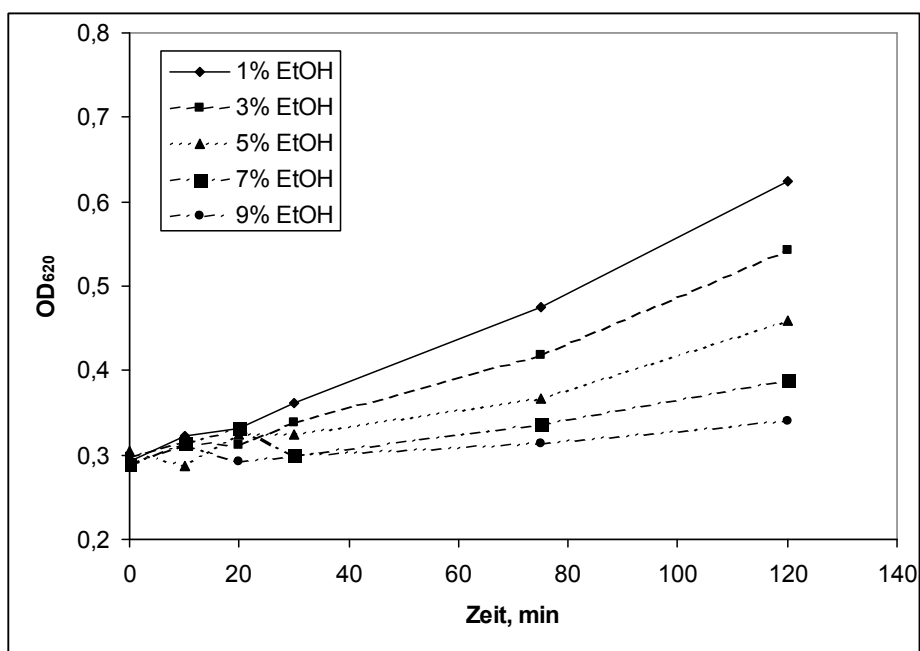


Abb. 32: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. plantarum* 92265

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5)

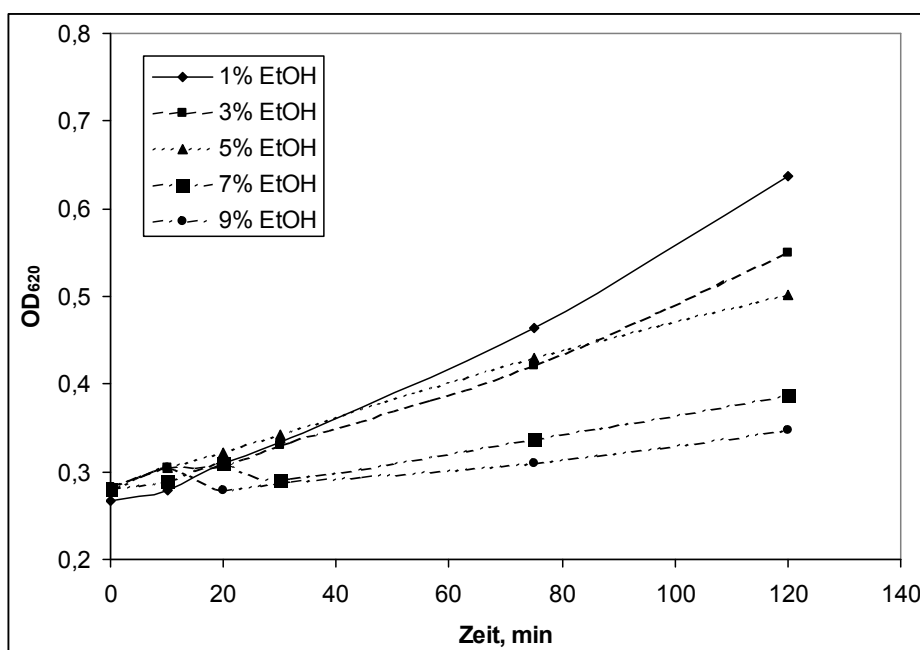


Abb. 33: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. plantarum* K4Lb6

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5)

In den Abbildungen 31 bis 33 wird das Verhalten der *Lb. plantarum*-Stämme während ihrer Wachstumsphase in MRS-Bouillon auf den Einfluss von 1, 3, 5, 7 und 9 % (v/v) Ethanol dar-

gestellt. Hierbei konnte beobachtet werden, ob die bei diesen kurzen Zeitintervallen der Messung der  $OD_{620}$  schwache Steigung abflacht, und das Zellwachstum somit frühzeitig (vgl. 3.4.1.1) in die stationäre Phase übergeht. Dies hätte bedeutet, dass die Zellen unter dem entsprechenden Ethanoleinfluss in ihrem Wachstum behindert worden wären. Bei *Lb. plantarum* 92260 erfolgte ein exemplarischer Vergleich mit einem Kurvenabschnitt aus einer Wachstumskurve mit 0 % Ethanol. In den obigen Abbildungen zeigen die Kurvenverläufe aller drei Stämme während der 120 min Inkubation bei abnehmenden Ethanolvolumina jeweils eine größere Steigung. Man sieht bei allen drei Stämmen tendenziell ein Abflachen der jeweiligen Kurven bei 9 % (v/v) Ethanol. Das bedeutet, die Zellen waren einer relativ starken Einschränkung in ihrem Wachstum während der log-Phase erlegen. Bei 7 % (v/v) Ethanol ist dieser Einfluss im Vergleich nicht mehr ganz so groß. Bei 5 % (v/v) Ethanol sieht man bei allen Stämmen, vor allem auch bei 92260 im letzten Zeitintervall zwischen 75 und 120 min eine gleichmäßige Steigung. Vergleicht man die Steigung bei 5 % Ethanol (v/v) bei *Lb. plantarum* 92260 mit der bei 0 % Ethanol, ist letztere etwas steiler. Allerdings sieht man auch, dass das Wachstum nicht gestoppt sondern etwas verlangsamt wurde. Das heißt, die Stämme zeigten bei einem resultierenden Ethanolvolumen von bis zu 5 % in den Ansätzen keine wesentliche Einschränkung ihres Wachstums während der log-Phase.

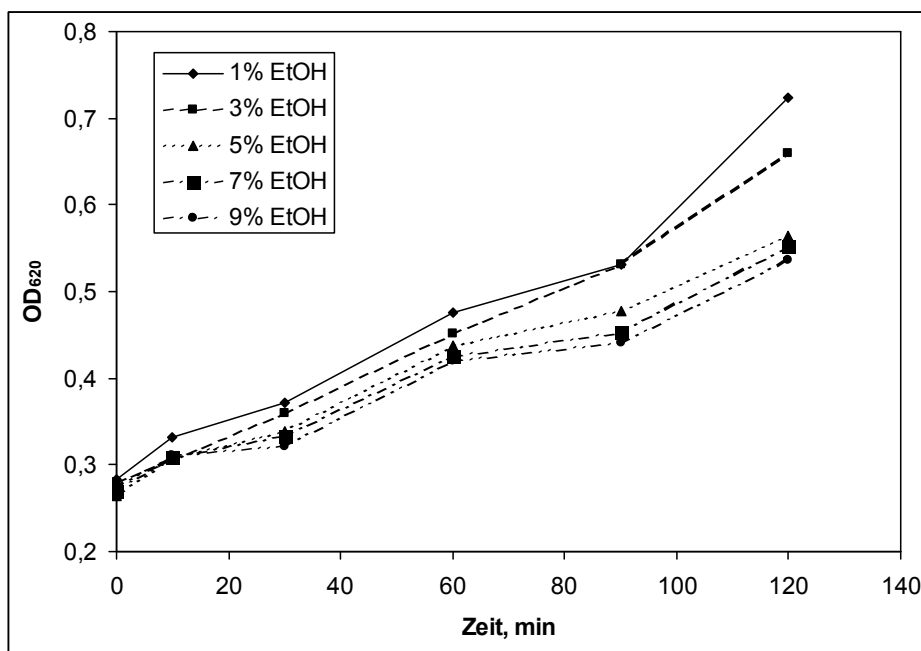
3.4.2.2 *Lb. rhamnosus*

Abb. 34: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. rhamnosus* 92255

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5)

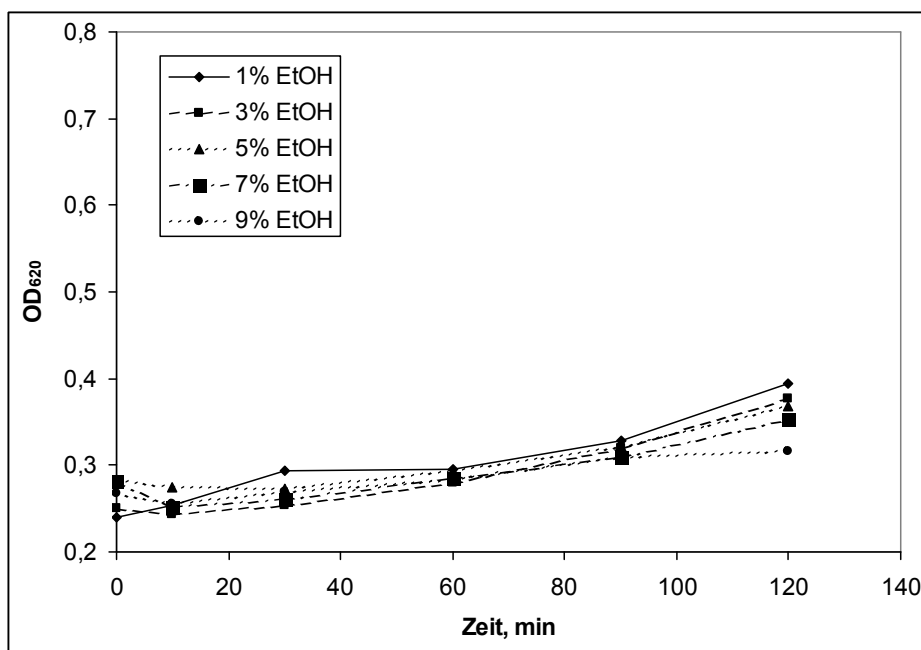


Abb. 35: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. rhamnosus* 92278

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5)

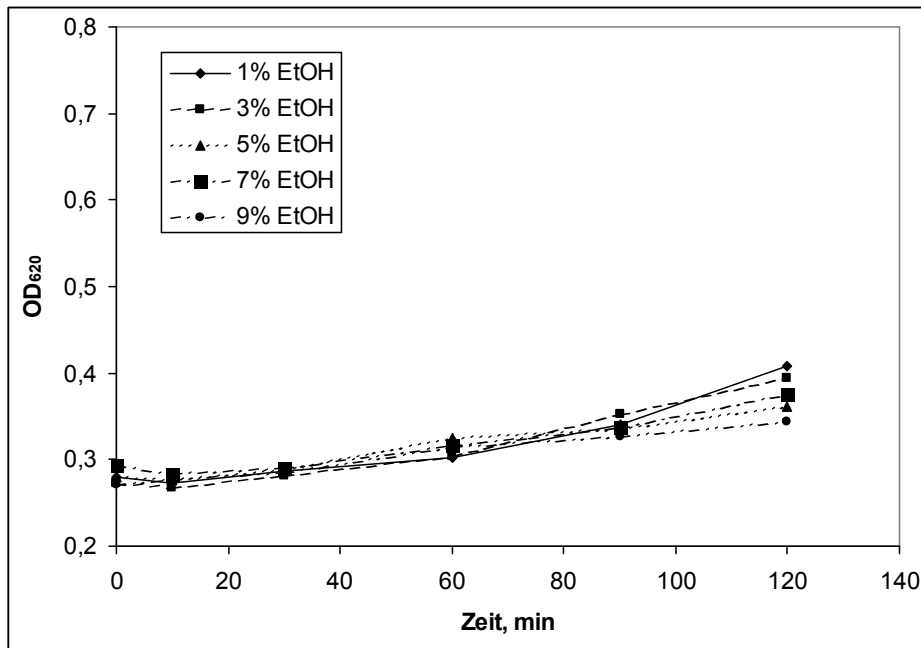


Abb. 36: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. rhamnosus* 92264

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5)

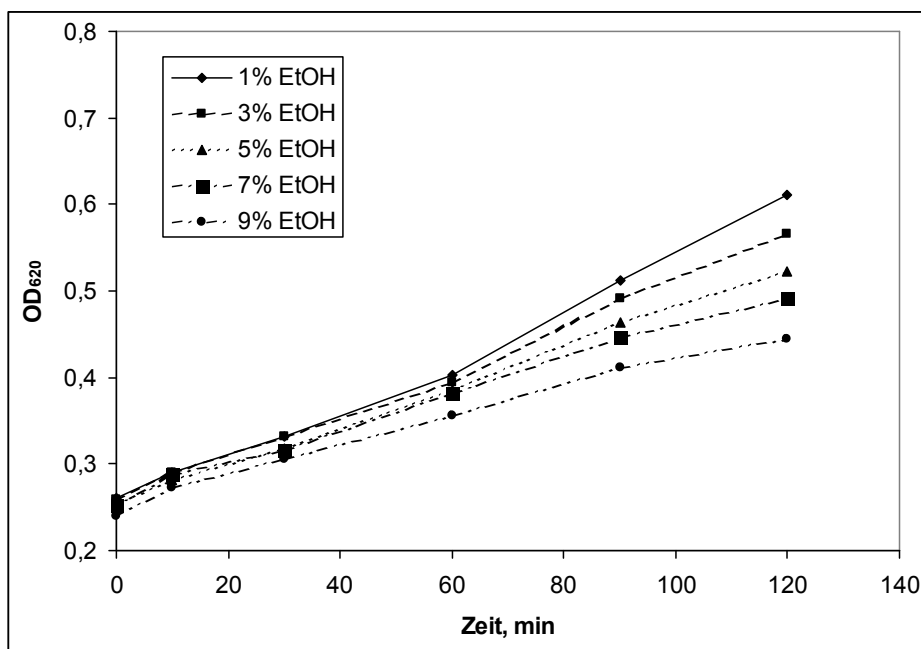


Abb. 37: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. rhamnosus* 92034

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5)

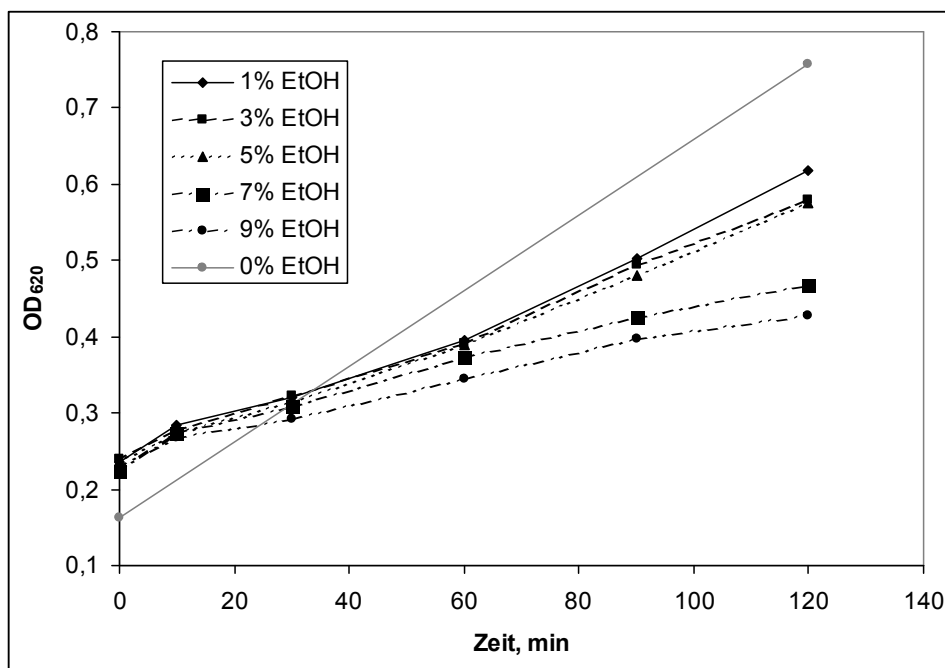


Abb. 38: Einfluss der Ethanolkonzentration auf das Zellwachstum von *Lb. rhamnosus* GG (ATCC 53103)

Kultivierung bei 37 °C in MRS-Bouillon (pH 5,5); Vergleich mit einem Kurvenabschnitt aus Wachstumsversuchen mit 0 % EtOH

In den Abbildungen 34 bis 38 wird das Verhalten der *Lb. rhamnosus*-Stämme während ihrer logarithmischen Wachstumsphase in MRS-Bouillon auf den Einfluss von 1, 3, 5, 7 und 9 % (v/v) Ethanol dargestellt. Es erfolgte ein exemplarischer Vergleich mit einem Kurvenabschnitt aus einer Wachstumskurve mit 0 % Ethanol *Lb. plantarum* GG (ATCC53103). Der Argumentation aus 3.4.2.1 folgend können die Stämme 92255, 92034 und GG (ATCC53103) bei einem Ethanolvolumen von 9 % in den Ansätzen im Vergleich zur Steigung bei 0 % Ethanol bei *Lb. plantarum* GG (ATCC53103) eingeschränkt weiterwachsen. Die Stämme 92278 und 92264 dagegen zeigen auch schon bei 1 % (v/v) Ethanol eine Abflachung der Wachstumskurve während der log-Phase. Allerdings ist dies nicht auf den Ethanoleinfluss sondern auf das Verhalten der Zellen im MRS-Bouillon zurückzuführen. Bei beiden Stämmen konnte man eine schlechte Löslichkeit mit einer damit verbundenen Agglutininierung auch in ethanolfreiem Flüssigmedium beobachten. In Folge dessen konnte man keine eindeutige OD messen. Lässt man diese beiden Stämme unberücksichtigt, galt für die übrigen *Lb. rhamnosus*-Stämme ein ähnliches Ergebnis wie für die *Lb. plantarum*-Stämme aus 3.4.2.1. Das bedeutet, das Wachstum wurde bei einem resultierenden Ethanolvolumen von bis zu 9 % nicht gestoppt sondern verlangsamt.

Die Stämme von *Lb. rhamnosus* zeigten bei einem resultierenden Ethanolvolumen von 5 % in den Ansätzen keine wesentliche Einschränkung ihres Wachstums während der log-Phase.

### 3.4.3 Fermentation von Rutin mit Stämmen von *Lb. plantarum* und *Lb. rhamnosus*

Die Ergebnisse der Fermentation von Rutin mit *Lb. plantarum*- und *Lb. rhamnosus*-Stämmen nach der Methode 2.3.5 mit dem Ziel der Umsetzung von Rutin zum 3-O-Glucosid Isoquercitrin sind hier qualitativ durch die HPLC-Chromatogramme in Abb. 39 und Abb. 40 dargestellt.

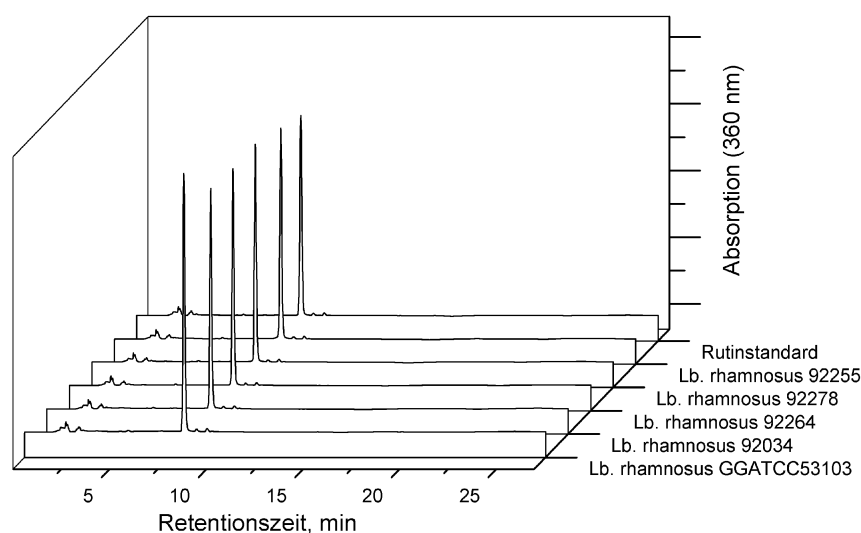


Abb. 39: HPLC-Kontrolle nach Fermentation von Rutin mit *Lb. rhamnosus*-Stämmen  
Fermentation von 0,05 % (*m/v*) Rutin für 24 h mit frischen logarithmischen Zellen ( $OD_{620}$  von  $\sim 0,4$ ) in 10 mL MRS-Bouillon (pH 5,5) bei 37 °C, gestoppt durch Zugabe von 10 mL Ethanol und Eiskühlung, Vergleichsansatz: analoge Behandlung ohne Kulturen („Rutinstandard“)



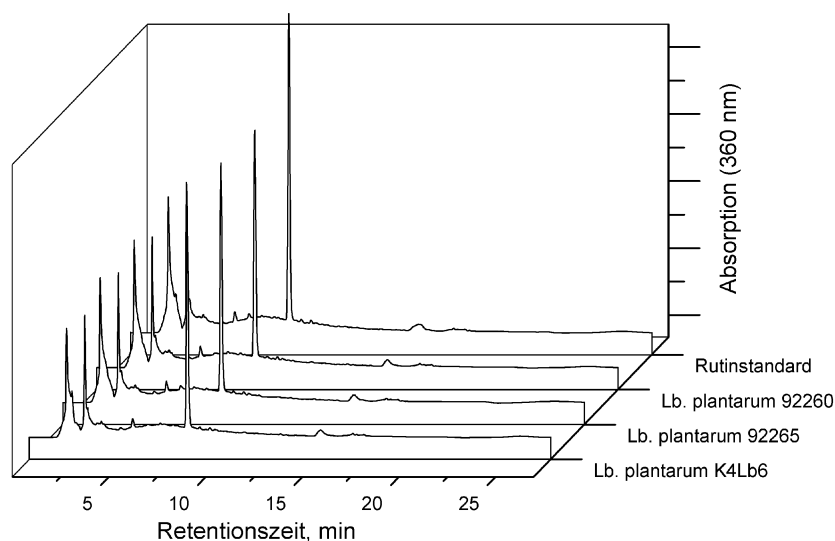


Abb. 40: HPLC-Kontrolle nach Fermentation von Rutin mit *Lb. rhamnosus*-Stämmen  
Fermentation von 0,05 % (*m/v*) Rutin für 24 h mit frischen logarithmischen Zellen ( $OD_{620}$  von  $\sim 0,4$ ) in 10 mL MRS-Bouillon (pH 5,5) bei 37 °C, gestoppt durch Zugabe von 10 mL Ethanol und Eiskühlung, Vergleichsprobe: analoge Behandlung ohne Kulturen („Rutinstandard“)

Die Chromatogramme zeigen jeweils keinen qualitativen Unterschied zum Rutinstandard, also zur nicht fermentierten Probe. Es hat keine Bildung von Isoquercitrin stattgefunden.

Die Fermentation wurde weiterhin für 72 h vollzogen und im Fall der Stämme von *Lb. rhamnosus*, die ein besseres Wachstum in MRS-Bouillon mit 2 % (*m/v*) L-(+)-Rhamnose gegenüber den Stämmen von *Lb. plantarum* zeigten (vergleiche 3.4.1.1 und 3.4.1.2), in MRS-Bouillon ohne Kohlenstoffquelle. Das Ergebnis entspricht dem oben beschriebenen, d.h. auch hierbei wurde kein Isoquercitrin gebildet.

#### 3.4.4 Nachweis von Rhamnosidaseaktivität in Zellaufschlüssen

Der Nachweis der Rhamnosidaseaktivität durch das in 2.3.7 vorgestellte Testsystem erfolgte nach Zellaufschluss gemäß 2.3.6. Der Aktivitätsnachweis diente der qualitativen Aussage über die mögliche Verwendung eines Stammes oder mehrerer Stämme von *Lb. rhamnosus* bzw. *Lb. plantarum* zur Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin. Die Aktivität wurde berechnet auf die

im Test freigesetzte Menge 4-Nitrophenol bezogen auf 1 g Nassgewicht Zellpellet vor Aufschluss. Die ermittelten Daten sind in Tab. 7 und Tab. 8 aufgeführt.

Tab. 7: Spezifische Rhamnosidaseaktivität der groben Enzymextrakte von *Lb. rhamnosus*-Stämmen

Inkubation in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) bei 37 °C, Positivkontrolle mit Hesperidinase, Start durch Zugabe von 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, Messung der Absorption (420 nm) des freigesetzten 4-Nitrophenols gegen 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) (molarer Extinktionskoeffizient bei  $A_{420}$  von  $\epsilon = 16,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurde zugrundegelegt (Molloy et al., 1994); Fehler angegeben als mittlere Abweichung,  $n = 2$

Probe	Freigesetzte Menge 4-Nitrophenol, $\mu\text{mol/g}$		
	nach 10 min	nach 100 min	nach 1000 min
<i>Lb. rhamnosus</i> 92255	$0,21 \pm 0,05^*$	$0,20 \pm 0,04^*$	$0,35 \pm 0,05^*$
<i>Lb. rhamnosus</i> 92278	$0,20 \pm 0,05^*$	$0,21 \pm 0,06^*$	$0,27 \pm 0,06^*$
<i>Lb. rhamnosus</i> 92264	$0,23 \pm 0,04^*$	$0,22 \pm 0,04^*$	$0,23 \pm 0,04^*$
<i>Lb. rhamnosus</i> 92034	$0,19 \pm 0,04^*$	$0,20 \pm 0,04^*$	$0,29 \pm 0,12^*$
<i>Lb. rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)	$0,16 \pm 0,01^*$	$0,16 \pm 0,00^*$	$0,19 \pm 0,00^*$
Positiv-Kontrolle	$41,16^\dagger$	$69,57^\dagger$	$78,96^\dagger$

\* bezogen auf Nassgewicht Zellpellet

$^\dagger$  bezogen auf Masse der Hesperidinase berechnet auf 1 g

Die Positiv-Kontrolle mit Hesperidinase zeigte wie erwartet schon nach 10 min eine Freisetzung von 4-Nitrophenol durch Hydrolyse des 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosids. Im Verlauf der Inkubation über 1000 min war eine deutliche Zunahme der freigesetzten Menge von 4-Nitrophenol zu verzeichnen. In Tab. 7 wurde auch eine Freisetzung des 4-Nitrophenols durch die Enzymextrakte aller *Lb. rhamnosus*-Stämme über den gesamten Inkubationszeitraum in der Größenordnung von 0,16 bis 0,35  $\mu\text{mol/g}$  ermittelt. Hier war keine wesentliche Zunahme während der gesamten Inkubationsdauer zu verzeichnen. Es wird daher angenommen, dass in den Inkubationslösungen bei 420 nm im Enzymextrakt befindliche Störfaktoren absorbieren und somit einen Fehler verursachen, der sich nach Berechnung als scheinbar freigesetzte Menge 4-Nitrophenol ausdrückt. Die Negativ-Kontrolle, die als Blindwert diente, konnte diese Störfaktoren nicht eliminieren, da es sich hier um 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-

rhamnopyranosid in reinem 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) handelte und somit eine vergleichbar unwesentliche Absorption bei 420 nm verursachte.

Tab. 8: Spezifische Rhamnosidaseaktivität der groben Enzymextrakte von *Lb. plantarum*-Stämmen

Inkubation in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) bei 37 °C, Positivkontrolle mit Hesperidinase, Start durch Zugabe von 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid, Messung der Absorption (420 nm) des freigesetzten 4-Nitrophenols gegen 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) (molarer Extinktionskoeffizient bei  $A_{420}$  von  $\epsilon = 16,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  wurde zugrundegelegt (Molloy et al., 1994)); Fehler angegeben als mittlere Abweichung,  $n = 2$

Probe	Freigesetzte Menge 4-Nitrophenol, $\mu\text{mol/g}$		
	nach 10 min	nach 100 min	nach 1000 min
<i>Lb. plantarum</i> 92260	$0,19 \pm 0,03^*$	$0,40 \pm 0,06^*$	$1,04 \pm 0,02^*$
<i>Lb. plantarum</i> 92265	$0,17 \pm 0,01^*$	$0,27 \pm 0,02^*$	$0,66 \pm 0,03^*$
<i>Lb. plantarum</i> K <sub>4</sub> Lb6	$0,19 \pm 0,00^*$	$0,37 \pm 0,00^*$	$1,29 \pm 0,06^*$
Positiv-Kontrolle	$41,16^\dagger$	$69,57^\dagger$	$78,96^\dagger$

\* bezogen auf Nassgewicht Zellpellet

$^\dagger$  bezogen auf Masse der Hesperidinase berechnet auf 1 g

Die Positiv-Kontrolle verhielt sich wie beim Aktivitätsnachweis der Enzymextrakte von *Lb. rhamnosus*-Stämmen beschrieben (siehe oben). Für die Enzymextrakte von *Lb. plantarum* 92260 ließ sich über den Zeitraum von 10 bis 1000 min eine Zunahme der Absorption messen und somit eine größer werdende Menge des 4-Nitrophenols berechnen. Das Gleiche gilt für die Enzymextrakte von *Lb. plantarum* 92265 und *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6. In allen Ansätzen war neben der zunehmenden Absorption auch eine Trübung zu beobachten, die bei fortschreitender Inkubation zunahm. Die Trübung war besonders stark in den Inkubationsansätzen mit Enzymextrakten von *Lb. plantarum* 92260. Bei einer Trübung bzw. bei einer nicht absoluten Klarheit der Lösungen kann eine Streuung des monochromatischen Lichts die Absorptionsmessung beeinträchtigen. Als Folge kann der Wert der gemessenen Absorption je nach Ausmaß der Beeinträchtigung beeinflusst werden. Das bedeutet, die hier mit Hilfe der gemessenen Absorption berechnete Menge an freigesetztem 4-Nitrophenol und somit die Intensität der mutmaßlichen  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität war unter Umständen verzerrt.

Zur genaueren Überprüfung der Messungen und auch der Beobachtungen wurden die groben Zellextrakte parallel mit Rutin als Substrat in gleicher Weise inkubiert. Die Inkubationslösungen wurden hierfür nach 1000 min in eine Vorlage mit Ethanol überführt und mittels HPLC analysiert. Für diese rein qualitative Analyse wurde keine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Chromatogramme zeigen Abb. 41 und Abb. 42.

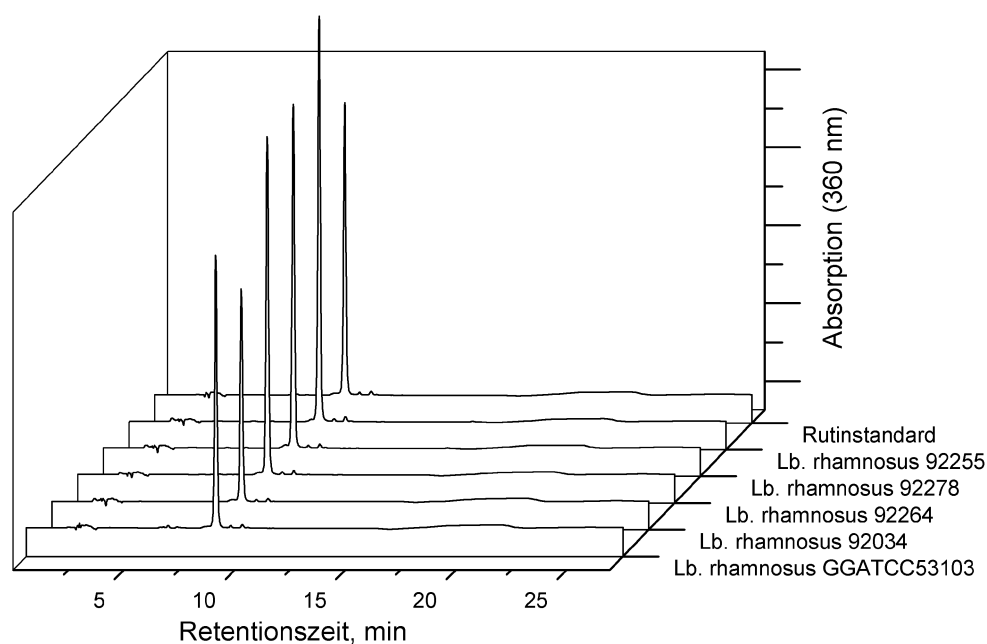


Abb. 41: HPLC-Kontrolle nach Inkubation von Rutin mit Zellextrakten von *Lb. rhamnosus*-Stämmen

Inkubation in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) bei 37 °C, Start durch Zugabe von 1%iger ethanolischer Rutinlösung, Vergleichsprobe: analoge Behandlung ohne Zellextrakt („Rutinstandard“)

Die Chromatogramme zeigen jeweils keinen qualitativen Unterschied zum Rutinstandard, also zur nicht mit Zellextrakten inkubierten Probe. Es hat keine Bildung von Isoquercitrin stattgefunden.

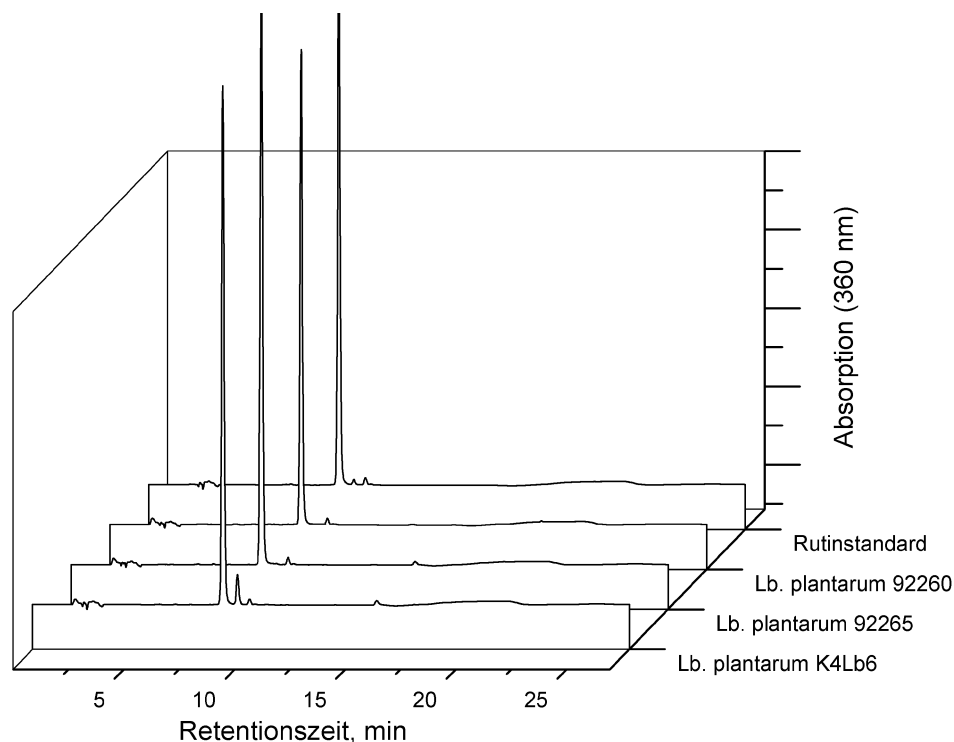


Abb. 42: HPLC-Kontrolle nach Inkubation von Rutin mit Zellextrakten von *Lb. plantarum*-Stämmen

Inkubation in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) bei 37 °C, Start durch Zugabe von 1%iger ethanolischer Rutinlösung, Vergleichsprobe: analoge Behandlung ohne Zellextrakt („Rutinstandard“)

Die beiden HPLC-Kontrollen nach Inkubation mit *Lb. plantarum* 92260 und 92265 zeigten jeweils keinen qualitativen Unterschied zum Rutinstandard, also zur nicht mit Zellextrakten inkubierten Probe. In diesen Fällen hat keine Bildung von Isoquercitrin stattgefunden. Das Chromatogramm nach Inkubation mit *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 zeigte einen qualitativen Unterschied zur nicht mit Zellextrakten inkubierten Probe. Nach dem starken Rutinsignal nach ca. 8,3 min Retention wurde eine weitere, nach ca. 9,1 min retendierende Substanz detektiert. Das schwache Signal konnte nach Aufstockung und mittels HPLC-ESI-MS mit einer Molekülmasse von 463 im negativen Ionisierungsmodus Isoquercitrin zugeordnet werden (siehe Anhang III.).

Von Bedeutung war, dass dieses qualitativ positive Ergebnis sowie ein positiver Nachweis der  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität nur erzielt werden konnte, wenn man die Zellpellets vor dem Aufschluss ausgiebig wusch (siehe 2.3.6). Enzymextrakte hergestellt aus ungewaschenen Zellen konnten eine entsprechende Hydrolyse jedoch nicht katalysieren. Dies legt die Vermutung nahe, die in die Inkubationsansätze verschleppten Inhaltsstoffe des MRS-Bouillons inhibieren

die Hydrolyse. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die D-(+)-Glucose, die als Substrat in Konkurrenz zu Rutin und 4-Nitrophenyl- $\alpha$ -L-rhamnopyranosid steht.

#### 3.4.5 Hydrolyse von Rutin mit Enzymextrakten aus *Lb. plantarum*-Stämmen

Rutin wurde mit groben Enzymextrakten aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 sowie 92260 und 92265 nach 2.3.8 inkubiert. Das qualitative Ergebnis ist in Abb. 43 mit Chromatogrammen, die aus den Inkubationsansätzen von *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 angefertigt wurden, dargestellt. Dieser Stamm war hinsichtlich vorhandener  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität der erfolgversprechendste Stamm (siehe 3.4.4 und Abb. 42).

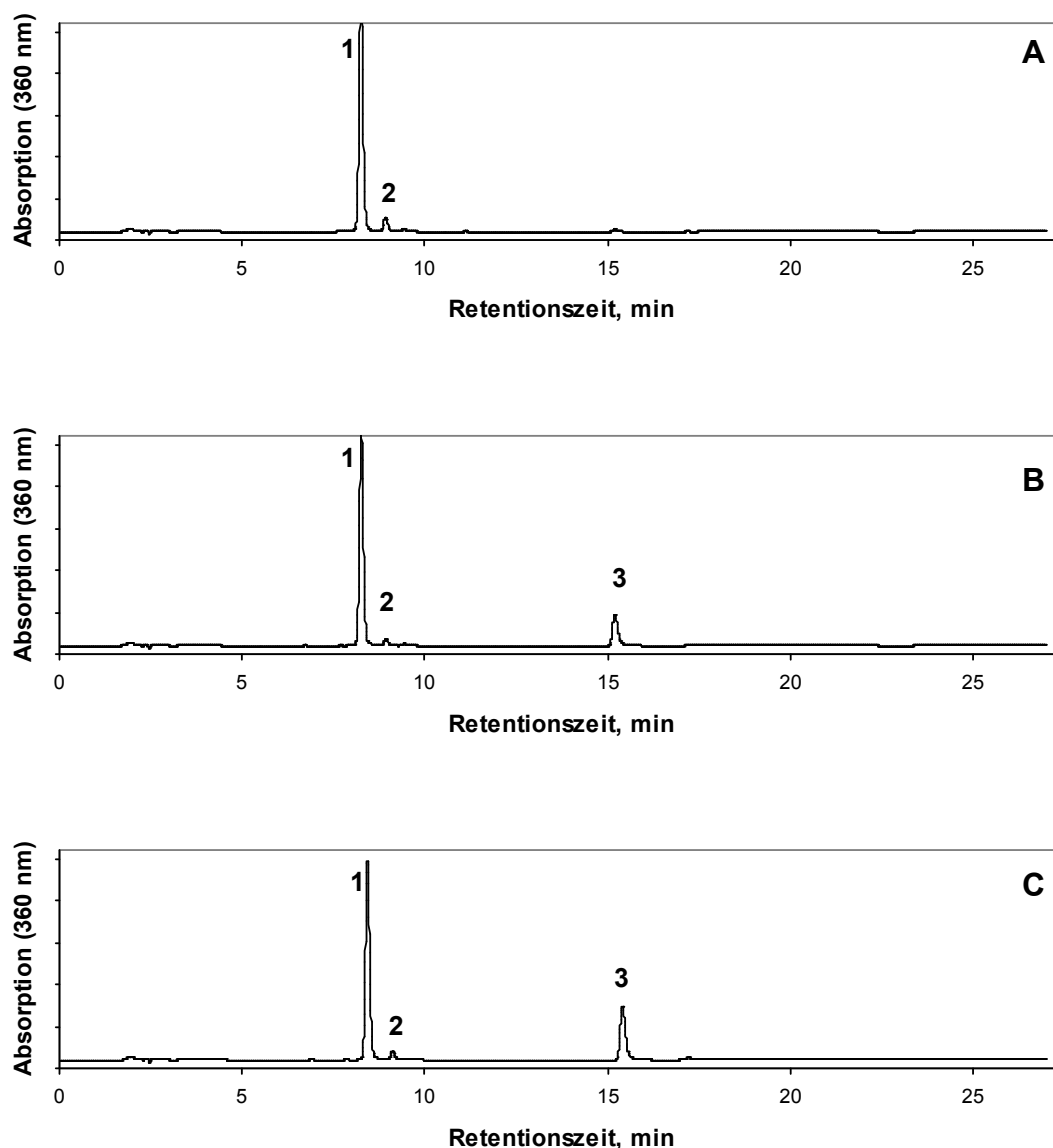


Abb. 43: HPLC-Chromatogramme der Inkubationsansätze von Rutin mit Enzymextrakten aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6

Inkubation in 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 5,5) bei 37 °C, gestoppt mit Ethanol, Messung mittels RP-HPLC bei 360 nm mit Gradientenelution (A) nach 16 h, (B) nach 40 h, (C) nach 64 h mit den Hydrolyseprodukten Isoquercitrin **2** ( $m/z$  463  $[M-H]^-$ ) und Quercetin **3** ( $m/z$  301  $[M-H]^-$ ) gebildet aus Rutin **1** ( $m/z$  609  $[M-H]^-$ )

In Chromatogramm A in Abb. 42 sieht man nach sechzehnständiger Inkubation neben dem deutlichen Rutinsignal (1) ein schwaches Signal (2) verursacht durch das Hydrolyseprodukt Isoquercitrin. Nach 40 h war ein ganz leichter Rückgang der Signale 1 und 2 im Chromatogramm B zu verzeichnen und es trat das Signal des zweiten Hydrolyseprodukts Quercetin

(3) auf. Im Verlauf der letzten 24 Stunden Inkubation war ein weiterer Anstieg von Signal 3 beobachtbar, einhergehend mit einer vermehrten Bildung von Quercetin. Gleichzeitig war der Abbau von Rutin zu verzeichnen, dessen Signal weiterhin eine leichte Schwächung erfuhr. Es war zu beobachten, dass die Hydrolyse des  $\alpha$ -L-Rhamnosidrests schneller ablief, als die Hydrolyse des  $\beta$ -D-Glucosidrests. Im Verlauf der Inkubation wurde das Hydrolyseprodukt Isoquercitrin früher gebildet als Quercetin. Dagegen schien das Enzym mit  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität die Katalyse früher einzustellen, denn das Isoquercitrinsignal erfuhr nach 16 h keine weitere Verstärkung.

Die Quantifizierung des Ergebnisses der Inkubation von Rutin mit Enzymextrakten aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6,92265 und auch 92260 pH 7,5 und pH 5,5 gibt Abb. 44 wieder.

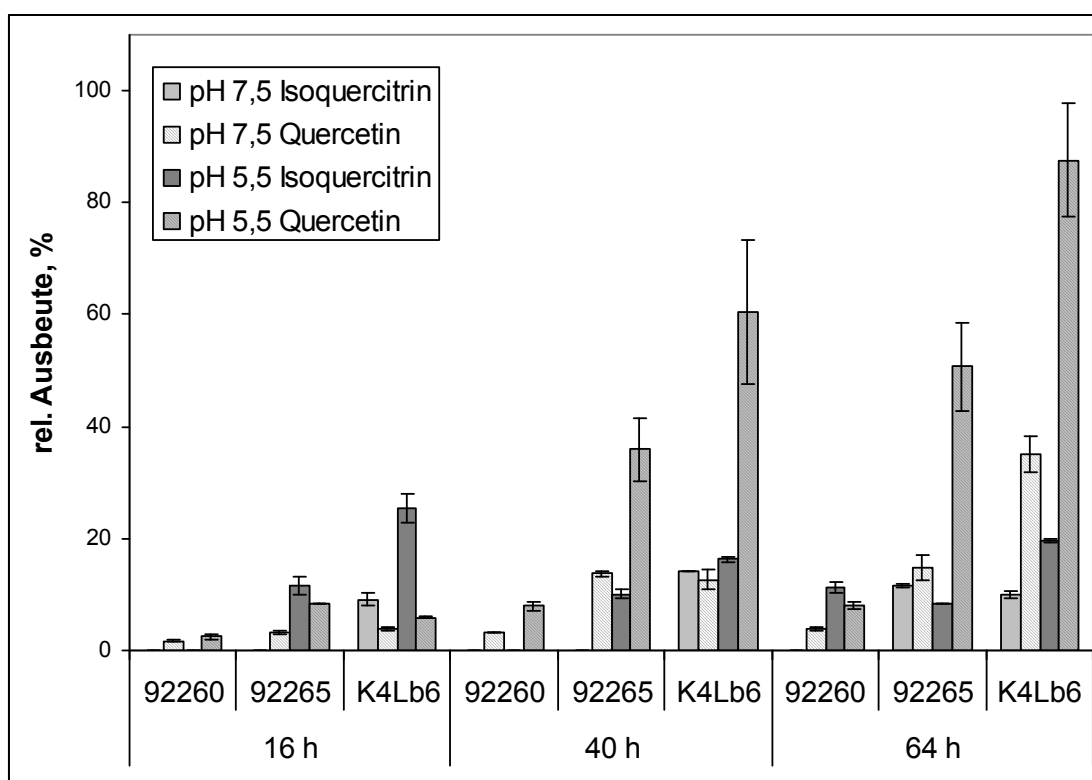


Abb. 44: Relative Ausbeuten in % an Isoquercitrin und Quercetin nach Inkubation von Rutin mit Enzymextrakten aus *Lb. plantarum*-Stämmen

Ausbeuten bezogen auf 1 g Nassgewicht Zellpellet, Inkubation für 16, 40 und 64 h in 50 mM Tris/HCl-Puffer (pH 7,5) und 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 5,5) bei 37 °C, Start durch Zugabe von Rutin, gestoppt mit Ethanol; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar, n = 2 (unabhängige Ansätze)

Die relative Ausbeute bezogen auf 1 g Nassgewicht des jeweiligen Zellpellets vor dessen Aufschluss wurde in der Einheit % angegeben. Hierbei wurde die Ausbeute bezogen auf die wie-



dergefundene Stoffmenge Rutin. Die Hydrolyserate von Rutin zu Isoquercitrin war am höchsten bei *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 mit einer relativen Ausbeute von rund 25 % bei pH 5,5 bzw. 9 % bei pH 7,5 (vgl. auch 3.4.4), wobei jedoch eine scheinbare Sättigung schon nach 16 h auftrat. Darüber hinaus sank die gebildete Menge Isoquercitrin ganz leicht wieder ab. Das zweite Hydrolyseprodukt Quercetin dagegen wurde im Vergleich zum Isoquercitrin nach 16 h in geringeren Mengen mit einer Ausbeute von rund 6 % bei pH 5,5 bzw. 4 % bei pH 7,5 gebildet. Die Ausbeute stieg jedoch über den gesamten Inkubationszeitraum kontinuierlich an und erreichte nach 64 h einen Wert von rund 88 % bei pH 5,5 bzw. 51 % bei pH 7,5. Die Ausbeuten an Isoquercitrin und Quercetin waren bei pH 5,5 höher als bei pH 7,5. Der Stamm 92265 zeigte einen ähnlichen zeitlichen Verlauf, auch hinsichtlich der unterschiedlichen pH-Werte in Bezug auf die Mengen beider Hydrolyseprodukte. Hier trat eine scheinbare Sättigung der Isoquercitrinkonzentration im Ansatz ebenfalls nach 16 h mit einer relativen Ausbeute von rund 11 % bei pH 5,5 ein. Die gebildete Menge sank auch hier ganz leicht während der weiteren Inkubation. Bei pH 7,5 dagegen wurde Isoquercitrin erst nach 64 h gebildet und erreichte eine relative Ausbeute von rund 12 %. Die Ausbeuten von Quercetin betrugen nach 16 h rund 8 % bei pH 5,5 und 3 % bei pH 7,5 und stiegen nach 64 h auf Werte von rund 51 % bei pH 5,5 und 15 % bei pH 7,5. Beim Stamm 92260 wurde nach 16 h Inkubation nur eine unwesentliche relative Quercetinausbeute von jeweils rund 2 % bei pH 5,5 und 7,5 erreicht. Diese stieg im Verlauf der Inkubation sehr schwach auf 4 % bei pH 7,5 bzw. 8 % bei pH 5,5 an. Das Produkt Isoquercitrin wurde zum Zeitpunkt nach 16 h und 40 h weder bei pH 7,5 noch bei pH 5,5 gebildet. Erst nach 64 h war eine relative Ausbeute von nur rund 11 % und auch nur bei pH 5,5 ermittelbar.

### 3.4.6 Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase

Zusätzlich zur Hydrolyse von Rutin mit Enzymextrakten aus *Lb. plantarum*-Stämmen (siehe 3.4.5) wurde die Inkubation von Rutin mit Hesperidinase nach 2.3.9 durchgeführt. Dieser Ansatz diente als Alternative zum Einsatz von Enzymextrakten aus den hier verwendeten Lactobacillenstämmen. Das qualitative Ergebnis ist durch die HPLC-Chromatogramme in Abb. 45 veranschaulicht.

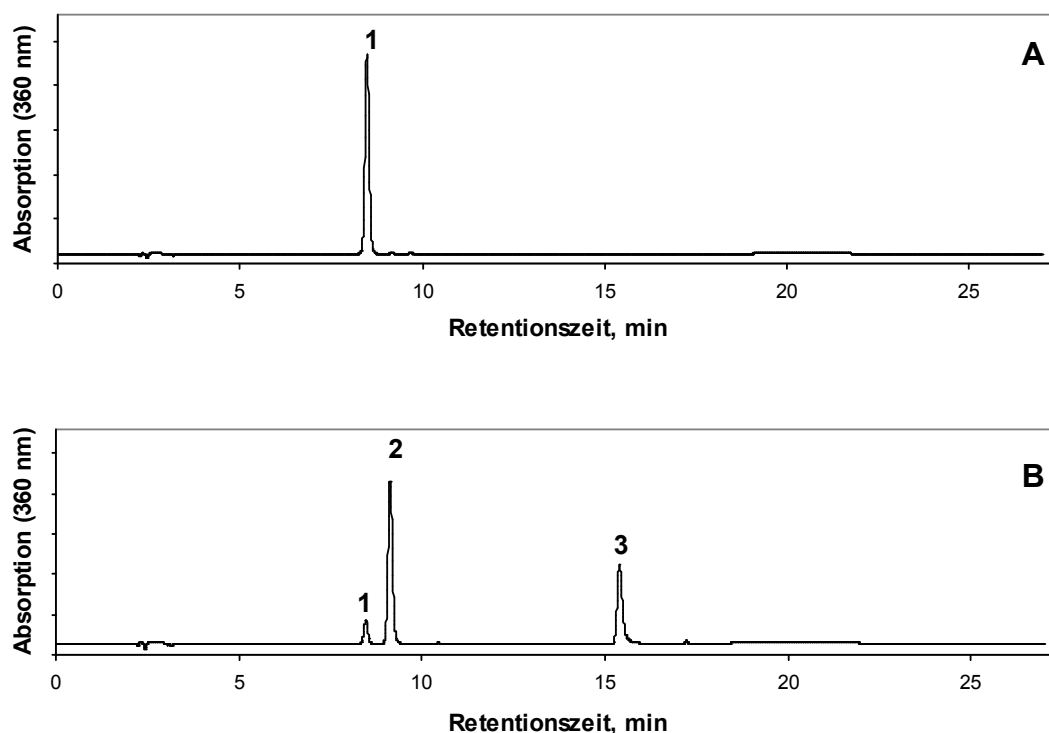


Abb. 45: HPLC-Chromatogramme der Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase  
Messung mittels RP-HPLC bei 360 nm mit Gradientenelution (A) nach 0 min mit Rutin **1** ( $m/z$  609  $[M-H]^-$ ), (B) nach 120 min mit den Hydrolyseprodukten Isoquercitrin **2** ( $m/z$  463  $[M-H]^-$ ) und Quercetin **3** ( $m/z$  301  $[M-H]^-$ )

Chromatogramm B zeigte eine Abnahme des Rutinsignals (1) gegenüber Chromatogramm A unter gleichzeitiger Bildung von Isoquercitrin (2) und Quercetin (3). Das bedeutet, die Inkubation von Rutin mit Hesperidinase verlief erwartungsgemäß unter Hydrolyse von Rutin zu den Produkten der durch  $\alpha$ -L-Rhamnosidase und  $\beta$ -D-Glucosidase katalysierten Reaktion Isoquercitrin und Quercetin.

Das Ergebnis nach Quantifizierung des Substrats und der Hydrolyseprodukte, gebildet während der enzymatischen Behandlung, ist in Abb. 46 dargestellt.

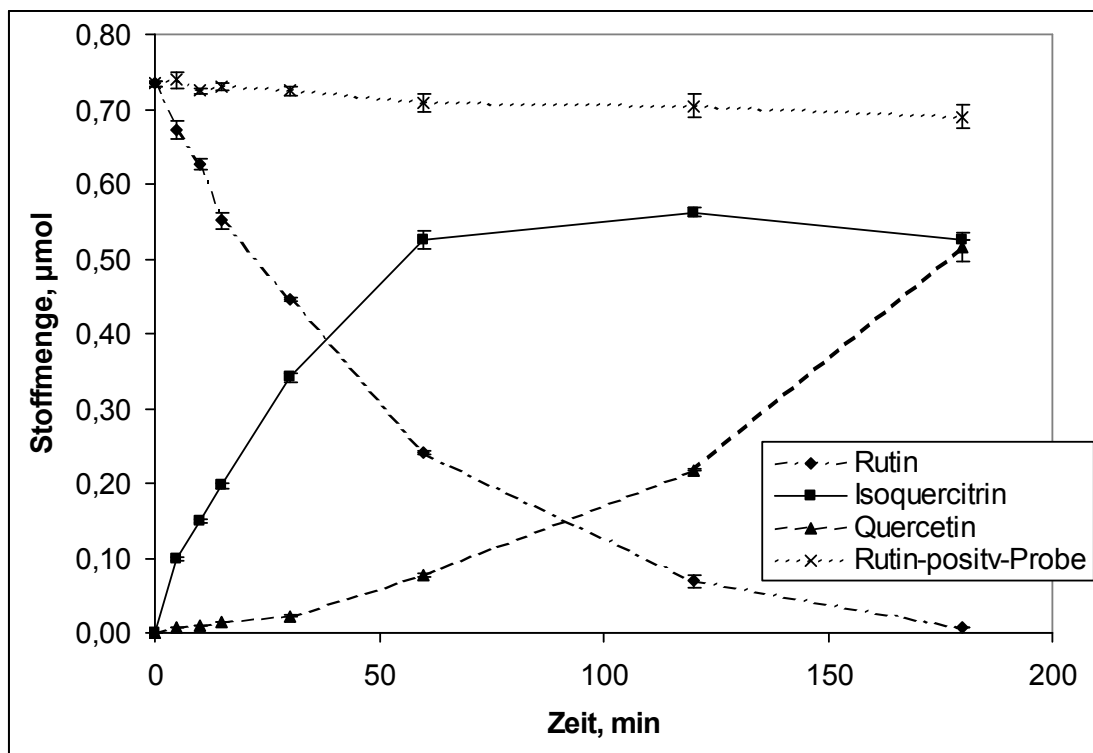


Abb. 46: Enzymatische Überführung von Rutin in Isoquercitrin durch Inkubation mit Hesperidinase

Inkubation in 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8) bei 40 °C, Stoffmengen der Flavonole in µmol in den Inkubationslösungen nach 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120 und 180 min im Vergleich zur analog behandelten Rutin-positiv-Probe ohne Hesperidinase; Fehlerindikatoren stellen die mittlere Abweichung dar,  $n = 2$

Im obigen Diagramm sieht man, dass die Rutin-positiv-Probe, also der nicht mit Hesperidinase inkubierte, ansonsten jedoch analog behandelte Ansatz, in dem Zeitraum von 3 h eine stete aber unwesentliche Abnahme von Rutin aufzeigte (von 0,73 bis  $0,69 \pm 0,02$  µmol). Demnach ist Rutin bei pH 3,8 und 40 °C für 3 h und darüber hinaus relativ stabil. Die mit Hesperidinase versetzten Inkubationsansätze wiesen innerhalb der 3 h eine rasche Abnahme von Rutin, unter gleichzeitiger Bildung und Zunahme von Isoquercitrin und auch Quercetin auf. Schon nach 5 min wurden aus 0,73 µmol Rutin bzw. Quercetin-3-*O*-rutinosid 0,1 µmol des Monoglucosids Isoquercitrin gebildet. Ein Abbau von Rutin um 50 % war nach ca. 50 min vollzogen. Das Maximum der enzymatisch katalysierten Bildung von Isoquercitrin war mit  $0,56 \pm 0,01$  µmol gemäß Abb. 46 nach 2 h zu verzeichnen. Dies entspricht bei der Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin einer Ausbeute von rund 77 %. Zum gleichen Zeitpunkt waren noch 0,07 µmol Rutin und 0,22 µmol vom zweiten Hydrolyseprodukt Quercetin in den Ansätzen messbar. Die Ergebnisse werden durch die unterschiedlichen Löslichkeiten von Edukt und

Syntheseprodukten in der resultierenden 80%igen ethanolischen Lösung nach Abbruch der Reaktion leicht verzerrt. Das bedeutet, das zu verzeichnende Verhältnis der Produkte zum Edukt gibt auch indirekt die Verteilung dieser Stoffe in besagtem Medium nach Membranfiltration wider. Das Aglykon Quercetin, das nicht angestrebte zweite Hauptprodukt der enzymatischen Derivatisierung mit Hesperidinase, entstand während der Inkubationsdauer vor allem während der ersten 1 h in relativ geringen Mengen. In den letzten beiden Inkubationsstunden konnte allerdings auch ein starker Anstieg verzeichnet werden. Besonders zum Zeitpunkt nach 3 h wurde eine unverhältnismäßig große Menge Quercetin in den Ansätzen gemessen, wodurch die Summe der Stoffmengen der Produkte größer war als die Stoffmenge des Edukts. Die Vermutung lag nahe, der Fehler durch die Löslichkeitsunterschiede der beteiligten Stoffe und eine eventuelle starke Störung des Reaktionsgleichgewichts durch die Probenahme im Zuge der Inkubation führte zu diesem quantitativ verzerrten Reaktionsergebnis.

#### 3.4.7 Behandlung von Buchweizenmehl mit Hesperidinase

Die in 3.4.6 behandelte Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase diente u.a. als Vorversuch zur quantitativen Orientierung bei der Inkubation von hitzebehandeltem Buchweizenmehl (ohne Schale) der Sorte Lifago mit Hesperidinase nach 2.3.10. Auch hier wird das qualitative Ergebnis durch HPLC-Chromatogramme dargestellt (siehe Abb. 47).

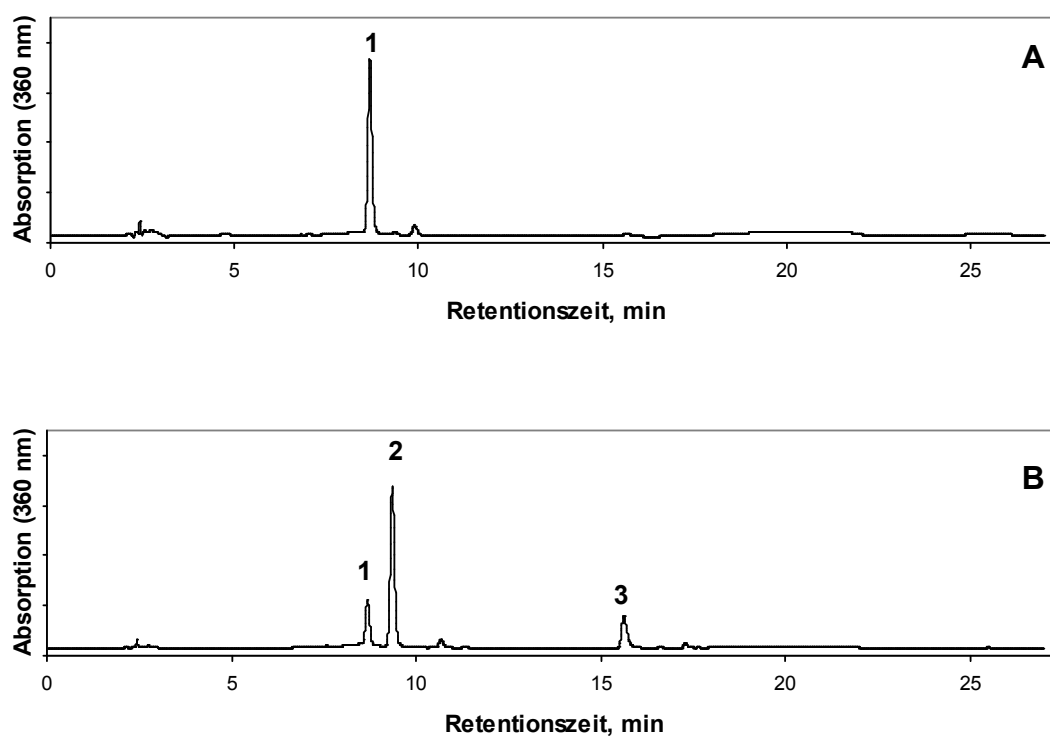


Abb. 47: HPLC-Chromatogramme der Inkubation von hitzebehandeltem Buchweizenmehl mit Hesperidinase

Messung mittels RP-HPLC bei 360 nm mit Gradientenelution (A) nach 0 min mit Rutin **1** ( $m/z$  609  $[M-H]^-$ ), (B) nach 120 min mit den Hydrolyseprodukten Isoquercitrin **2** ( $m/z$  463  $[M-H]^-$ ) und Quercetin **3** ( $m/z$  301  $[M-H]^-$ )

Das starke Signal (1) in Chromatogramm A stammte von Rutin, dem dominierenden Flavonoid im Buchweizenmehl. Chromatogramm B zeigte eine Abnahme des Rutinsignals (1) unter gleichzeitiger Bildung von Isoquercitrin (2) und Quercetin (3) (vgl. Chromatogramm B aus Abb. 45). Die Inkubation von hitzebehandeltem Buchweizenmehl mit Hesperidinase verlief also ebenfalls unter Hydrolyse von Rutin zu den Produkten Isoquercitrin und Quercetin.

Der Erfolg dieser Derivatisierung wird nach Quantifizierung des im Mehl vorliegenden Rutins und der Hydrolyseprodukte, gebildet durch die enzymatisch katalysierte Reaktion in Abb. 48 veranschaulicht.

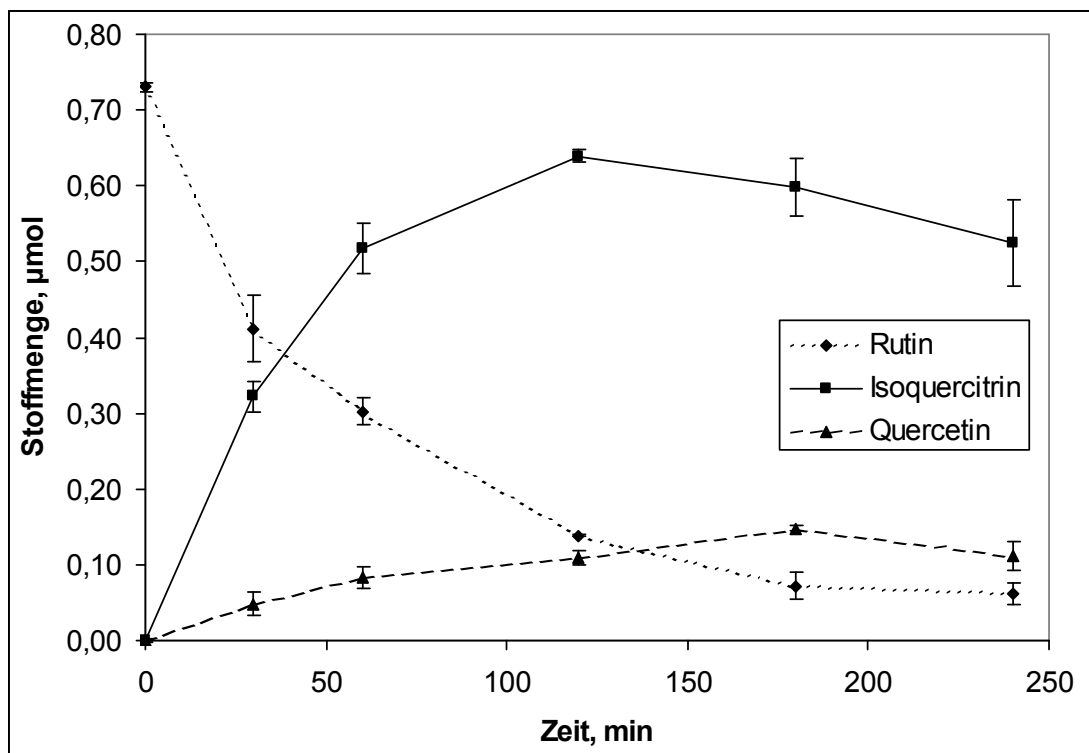


Abb. 48: Inkubation von Hesperidinase mit hitzebehandeltem Buchweizenmehl  
Inkubation in 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8) bei 40 °C, Stoffmengen der Flavonole in µmol in den Inkubationslösungen nach 0, 30, 60, 120, 180 und 240 min; F = 2

Die Ansätze mit hitzebehandeltem Lifago-Mehl und Hesperidinase in 0,1 M HCl/Na-Citrat-Puffer (pH 3,8) wiesen während der vierstündigen Inkubation eine rasche Abnahme des Flavonol-3-*O*-glykosids Rutin unter gleichzeitiger Bildung und Zunahme von Isoquercitrin und Quercetin auf. Die initiale Rutinstoffmenge von 0,73 µmol zum Zeitpunkt 0 war nach ca. 50 min zu 50 % abgebaut. Das Maximum der enzymatisch katalysierten Bildung von Isoquercitrin war hier mit  $0,64 \pm 0,01$  µmol 2 h zu verzeichnen. Setzt man auch hier einen äquimolaren Umsatz bei der Hydrolyse von Rutin zu Isoquercitrin voraus, hätte dies eine Ausbeute von 88 % zur Folge. Die Ungenauigkeit hierbei entspricht im wesentlichen der aus 3.4.6. Auch hier waren zum gleichen Zeitpunkt noch 0,14 µmol Rutin und 0,11 µmol vom zweiten Hydrolyseprodukt Quercetin in den Ansätzen messbar und somit die Summe der Stoffmengen von Edukt und beider Produkte mit rund 0,89 µmol größer als die eingesetzte Stoffmenge des Edukts. Die Ungenauigkeit erklärt sich zum einen ebenfalls aus den differierenden Löslichkeiten von Edukt und Syntheseprodukten in der resultierenden 80%igen ethanolischen Lösung nach Abbruch der Reaktion. Zum anderen quoll das Buchweizenmehl in den Ansätzen während der Inkubation immer mehr auf, was ein besseres Eindringen der Inkubationslösung zur

Folge hatte. Dadurch konnte wiederum Rutin als Substrat für die Hesperidinase besser zugänglich gemacht werden. Nach 3 und 4 h Inkubation gab es eine scheinbare Abnahme des Isoquercitrins. Das Aglykon Quercetin entstand während der Inkubationsdauer in relativ geringen Mengen. In der letzten Stunde der Inkubation konnte auch hier ein geringfügiger Abbau verzeichnet werden. Aus dem in den Abbildungen schwach ersichtlichen Abbau von Isoquercitrin und Quercetin, kann man schließen, dass sich nach ca. 3 bis 4 Stunden das Gleichgewicht der hydrolytischen Reaktion eingestellt hatte.

## 4 Diskussion

### 4.1 Bewertung von Buchweizen hinsichtlich seiner Rutin- und Quercetingehalte

Grundlegend für das Ziel dieser Arbeit ist die Verwendung einer Buchweizenart und –sorte mit einem vergleichbar hohen Gehalt an Rutin. Da Rutin sowie Quercetin und, mit der höchsten Bioverfügbarkeit unter den Derivaten, Isoquercitrin vielschichtig ausgeprägte physiologische Eigenschaften und Wirkungen überwiegend positiver Natur zugeschrieben werden, könnten diese Verbindungen in Buchweizen zu einer funktionellen und präventiven Ernährung beitragen (siehe 1.1).

Eingangs wurden Freilandversuche zur Kultivierung von Echem Buchweizen der Sorten Bamby, Hruszowska und Lileja sowie Tatarischem Buchweizen der Sorte Lifago durchgeführt (siehe 2.1.1 und 3.1). Hier sollte eine Verifizierung der gegenüber Echem Buchweizen in den Samen und auch in den Blättern höheren Rutin- und Quercetingehalte im Tatarischen Buchweizen erfolgen. Weiterhin wurden die eventuellen Einflüsse durch Erntezeitpunkt und Stickstoffdüngung auf die Rutin- und Quercetingehalte der Blätter untersucht. Bei den Samen wurde nur der Einfluss durch Stickstoffdüngung berücksichtigt, da diese nur zu einem Termin, der Samenreife, geerntet worden waren. Schon im Saatgut für die folgende Kultivierung ließen sich die Sorten hinsichtlich ihres Rutingehalts einstufen. Die höchsten Gehalte zeigte erwartungsgemäß das Saatgut des Tatarischen Buchweizens Lifago mit rund 91 mg/kg TS des ungeschälten Samens. Die Gehalte an Rutin in den Sorten des Echten Buchweizens Bamby, Hruszowska und Lileja waren kleiner als 2 mg/kg TS und im Mittel rund 70 % niedriger als in Lifago (siehe 3.1.1).

Entsprechendes gaben die Feldversuche hinsichtlich der Rutingehalte in Buchweizensamen wieder (siehe 3.1.2). In den Sorten Bamby, Hruszowska und Lileja war mit rund 90 % des Gehalts signifikant weniger Rutin enthalten als in den Lifago-Samen. Dies entspricht auch weitestgehend den ermittelten Gehalten in der Literatur (siehe Tab. 3 und Tab. 4). Das in Spuren vorhandene Quercetin in den Samen aller Sorten, also in Echem und Tatarischen Buchweizen ist ebenfalls im Einklang mit Studien anderer Autoren (Fabjan et al., 2003; Steadman et al., 2001). Also konnten die hohen Rutingehalte in den Samen der Tatarischen Buchweizensorte Lifago gegenüber den übrigen Echten Buchweizensorten mit deutlich niedrigerem Rutingehalt verifiziert werden. Ein Einfluss durch Stickstoffdüngung auf die Rutin- und Querce-



tingehalte konnte nicht beobachtet werden. So haben auch beispielsweise (Mogren et al., 2006) keinen Einfluss durch Stickstoffdüngung auf die Quercetingehalte in Zwiebeln beobachten können. Ein solcher Einfluss ist bei pflanzlichen Sekundärmetaboliten nur unter besonderen Umständen bei induziertem Stickstoffmangel zu beobachten und begründet sich dann durch eine physiologische Ausgleichsbeziehung zwischen Pflanzenwachstum und Sekundärmetabolitproduktion (Herms & Mattson, 1992). Stickstoff ist ein essentieller Makronährstoff, der entsprechend in relativ hohen Mengen zum Wachstum, aber auch für die Produktion von Aminosäuren, Enzymen und Proteinen benötigt wird (Bryant et al., 1983). Unter einer Stickstoffmangelbedingung wird die Produktion von wachstumsfördernden Faktoren zugunsten der Produktion von zum Pflanzenschutz vorgesehenen Sekundärmetaboliten zurückgehalten (Herms & Mattson, 1992). Genauer werden unter Nährstoffmangel auf Kohlenstoff basierende Komponenten, also auch Sekundärmetabolite, in der Produktion gefördert (Bryant et al., 1983). Unter den für diese Arbeit vorherrschenden Anbaubedingungen, also bei den Freilandversuchen, wurde kein Stickstoffmangel erzeugt. Die Stickstoffdüngung führte zu einer Ergänzung der Makronährstoffe im Boden. Also ist der nicht vorhandene Einfluss durch Stickstoffdüngung auf die Rutin- und Quercetingehalte der Buchweizensamen konform mit der Literaturmeinung.

Die Ergebnisse zu den Rutin- und Quercetingehalten der Blätter hinsichtlich sortentypischer Unterschiede entsprechen überwiegend denen zu den Rutingehalten der Samen (siehe 3.1.3). Die Tatarische Buchweizensorte Lifago zeigte gegenüber den Echten Buchweizensorten signifikant höhere Rutingehalte von rund 689 bis 765 mg/kg TS (Abb. 9). Bei den Echten Buchweizensorten sanken die ermittelten Rutingehalte in der Reihenfolge Hruszowska, Lileja und Bamby. Allerdings war der Unterschied nicht ganz so deutlich wie bei den Samen. Enthielten die Samen der Echten Buchweizensorten rund 90 % weniger Rutin (siehe oben), waren es bei den Blättern lediglich rund 30 bis 40 % weniger. Im Gegensatz zu dem größtenteils nur in Spuren vorhandenen Quercetin in den Samen, konnte in den Blättern Quercetin in allen hier verwendeten Buchweizensorten quantifiziert werden (Abb. 12). Die Quercetingehalte aller Sorten, unabhängig von der Düngung, waren allerdings gegenüber den Rutingehalten um rund ein Hundertstel kleiner und befanden sich im ein- bis knapp zehnstelligen ppm-Bereich. In Bezug auf die Samen wiederum waren die Rutingehalte in den Blättern der Sorten des Echten Buchweizens im Mittel rund 200 mal höher. Beim Tatarischen Buchweizen der Sorte Lifago waren die Rutingehalte der Blätter unabhängig von der Düngung gegenüber den Samen entsprechend nur sechs mal höher. Folglich konnten hier die hohen Rutin- und Quercetingehalte

in den Blättern der Tatarischen Buchweizensorte Lifago gegenüber den übrigen Echten Buchweizensorten mit niedrigeren Gehalten verifiziert werden.

Eine Stickstoffdüngung übte auf die Rutingehalte der Blätter aller Sorten den gleichen Einfluss (siehe Abb. 11, sowie Kommentare dazu). Die Quercetingehalte lagen zum einen nahe am Ultraspurenbereich und unterlagen zum anderen relativ starken Schwankungen. Darum wird der Einfluss durch Stickstoffdüngung auf die Quercetingehalte der Blätter (siehe Abb. 14, sowie Kommentare dazu) als unwesentlich betrachtet. Auf die wesentlich höheren Rutingehalte übte die Stickstoffdüngung scheinbar einen negativen Einfluss (vgl. auch Tab. 9). Hier muss allerdings eine durch Stickstoffdüngung stärkere Grünmassebildung bzw. ein höherer Sprosstrockenmasseertrag berücksichtigt werden. Demnach trat ein Verdünnungseffekt bei den Rutingehalten, die auf kg Trockensubstanz oder auch –masse bezogen wurden, auf. Der Effekt wird deutlich, korrigiert man die geschätzten Randmittel der Rutingehalte aus der Varianzanalyse mit einem Verdünnungsfaktor, gebildet aus den Mittelwerten der Sprosstrockenmasseerträge ohne und mit Stickstoffdüngung. Hiermit wurden die Rutingehalte der Blätter mit Düngung korrigiert. Die korrigierten Gehalte weisen unter Berücksichtigung der Standardabweichungen keinen wesentlichen Unterschied und somit keinen Effekt auf (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Sprosstrockenmasseerträge der Buchweizenernte 2007

Sorte	Stickstoffdüngung	Mittelwert Sprosstrockenmasseertrag, t TM/ha (n=3)	VF	Rutingehalt, mg/kg TS (n=12)	STABW	Korrigierter Gehalt, mg/kg TS
Bamby	0 kg N/ha	4,3364		465,2	82,9	
	120 kg N/ha	4,7933	ca. 1,1	438,0	11,6	484,1
Hruszowska	0 kg N/ha	4,8107		579,5	49,9	
	120 kg N/ha	6,6342	ca. 1,4	487,6	70,1	672,5
Lifago	0 kg N/ha	5,8561		764,9	103,5	
	120 kg N/ha	6,1944	ca. 1,1	689,0	130,2	728,8
Lileja	0 kg N/ha	5,3428		503,1	127,8	
	120 kg N/ha	5,6915	ca. 1,1	461,4	68,7	491,6

gerundeter Mittelwert Sprosstrockenmasseertrag aus (Goeritz et al., 2009); VF = Verdünnungsfaktor; STABW = Standardabweichung; geschätzte Randmittel der Rutingehalte aus der Varianzanalyse

Korrigierter Gehalt =  $\text{Rutingehalt}_{120 \text{ kg N/ha}} \cdot \text{Mittelwert TM}_{120 \text{ kg N/ha}} / \text{Mittelwert TM}_{0 \text{ kg N/ha}}$

Folglich hat eine Stickstoffdüngung keinen Einfluss auf die Rutin- sowie Quercetingehalte der Buchweizenblätter. Wie bei der Argumentation zum Stickstoffeinfluss auf die Flavonolgehalte in den Samen ausgeführt, ist ein solcher Einfluss unter Umständen bei induziertem Stickstoffmangel zu beobachten (siehe oben und (Hermes & Mattson, 1992)).

Der Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Rutingehalte der Blätter erreichte Signifikanz (siehe 3.1.3). Es zeigte sich, dass die Blätter der Sorten Hruszowska und Lileja zum Zeitpunkt der Blüte bzw. in der Blütephase geerntet werden sollten, will man einen leicht erhöhten Rutingehalt in den Blättern gewährleisten (siehe Abb. 10). Die Gehalte bei der Sorte Hruszowska waren nur rund 2 % höher als zum Zeitpunkt der Vorblütephase, aber 11 % höher als zur Samenreife. Bei der Sorte Lileja waren die Rutingehalte in der Blütephase 2 % höher als in der Vorblütephase und 29 % höher als zum Zeitpunkt der Samenreife. Die Blätter der Sorte Bamby hatten in der Vorblütephase 10 % bzw. 34 % höhere Rutingehalte als in der Blütephase bzw. zum Zeitpunkt der Samenreife. Berücksichtigt man hier die Trockenmasseerträge jedes Erntezeitpunkts und korrigiert die Gehalte entsprechend der geschätzten Randmittel der Gehalte aus der Varianzanalyse bezogen auf Düngung (siehe oben), gibt es hier leichte Verände-

rungen. So sind die Rutingehalte bei der Sorte Hruszowska zur Blütephase 2 % höher als zur Samenreife und bei Lileja 15 % höher. Die Sorte Bamby hat den besten Erntezeitpunkt hinsichtlich hoher Rutingehalte in den Blättern anschließend ebenfalls zur Blütephase. Bei der Sorte Lifago war der Einfluss des Erntezeitpunkts am schwächsten ausgeprägt. Der Erntezeitpunkt mit den höchsten Rutingehalten in den Blättern entspricht allerdings dem, der höchsten Trockenmasseerträge, dem Zeitpunkt der Samenreife. Es gibt also für alle Buchweizensorten einen Erntezeitpunkt, an dem optimale Rutingehalte in den Blättern zu erwarten sind. Für die nahe dem Ultraspurenbereich liegenden Quercetingehalte hingegen gilt das gleiche wie in der Diskussion über den Einfluss der Stickstoffdüngung auf die Gehalte in Buchweizenblättern (siehe oben). Der Einfluss des Erntezeitpunkts auf die Quercetingehalte der Blätter wird ebenfalls als unwesentlich betrachtet. Schließlich bleibt festzuhalten, dass die Blätter der Sorten des Echten Buchweizens zum Zeitpunkt der Blütephase beerntet werden sollten, will man hohe Rutingehalte erzielen. Bei der Sorte des Tatarischen Buchweizens Lifago dagegen sollten Blätter reich an Rutin zum Zeitpunkt der Samenreife geerntet werden. Letztere Tatsache ist durchaus positiv, da man die Ernte hinsichtlich hoher Samen- bzw. Kornerträge natürlich zum selben Zeitpunkt durchführt.

Die Tatarische Buchweizensorte Lifago hat also die höchsten Rutin- und Quercetingehalte sowohl in den Samen als auch in den Blättern und benötigt zur Optimierung dieser Gehalte keine Stickstoffdüngung. Der beste Erntetermin der Blätter fällt auf den Zeitpunkt der Samenreife und steht somit im Einklang mit hohen Kornerträgen. Somit ist Lifago eine für das Ziel dieser Arbeit durchaus adäquate Buchweizensorte.

Schließlich wurde die Verteilung von Rutin und Quercetin im ganzen Samen der Tatarischen Buchweizensorte Lifago zur quantitativen Lokalisierung der Flavonole in Samen und Schale untersucht (siehe 3.1.4). (Fabjan et al., 2003)) geben Rutingehalte von 81 bis 166 mg/kg TS in verschiedenen tatarischen Sorten an. Die Quercetingehalte befanden sich im Spurenbereich. (Jiang et al., 2007)) geben lediglich Rutingehalte von 157 bis 180 mg/kg an. Damit stimmen die in dieser Arbeit ermittelten Rutingehalte von rund 100 mg/kg TS Samen bzw. 30 mg/kg Schale mit der Literatur nahezu überein. Die als leicht einzustufenden Differenzen gegenüber (Jiang et al., 2007) resultieren vermutlich aus einem Sortenunterschied und den unterschiedlichen Extraktions- und Bestimmungsmethoden. Die Quercetingehalte befanden sich hier mit 0,7 mg/kg im Samen und 0,1 mg/kg in der Schale ebenfalls im Spurenbereich (siehe 3.1.4).

## 4.2 Behandlung von Modellbuchweizenteig

Der Abschnitt 3.2 Stabilität von Rutin und Quercetin im Modellbuchweizenteig gegenüber verschiedenen Temperaturen thematisiert die Ergebnisse der Hitzebehandlungen eines Lifago-Mehl/Wasser-Gemischs im Konvektomat. Hierbei dienten die Ergebnisse dem Zweck einer hypothetischen Kontrolle über Temperatur und Behandlungsdauer hinsichtlich des Erhalts von Rutin und Quercetin. Weiterhin sollte die für die Samen des Tatarischen Buchweizens typische enzymatische Hydrolyse Rutins im wässrigen System verifiziert werden. Da es sich bei dem Mehl/Wasser-Gemisch gleichsam um Modellbuchweizenteig handelt, werden die Behandlungen im folgenden auch als Backversuche bezeichnet.

Das Ergebnis aus 3.2.1 stellt die Veränderung der Gehalte an Rutin und Quercetin in Lifago-Mehl im wässrigen Milieu bzw. während des Anteigens dar. Es war deutlich zu sehen, dass Rutin spontan unter Abspaltung des Rutinoserests, bzw. 6-O-( $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl)- $\beta$ -D-glucopyranosidrests, äquimolar zu Quercetin nahezu komplett hydrolysiert wurde (siehe Abb. 15) und sich somit wie in Literatur beschrieben verhält (Suzuki et al., 2002). Während der übrigen Anteig- bzw. Quellzeit blieben die Gehalte gegenüber dem wässrigen System jeweils stabil. Die Informationen hieraus gaben Gewähr für eine verbesserte Wiederholbarkeit in Bezug auf die Durchführung der anschließenden Backversuche, da diese aufgrund der Handhabbarkeit bei der Teigbereitung, wie vor allem Sicherung der Homogenität der Mehl-in-Wasser-Suspension, quantitatives Überführen und auch das Einhalten gleicher Quellzeiten relativ anfällig für Fehler waren. Eine befriedigende Aufklärung der Kinetik der enzymatisch katalysierten Hydrolyse war hier nicht angestrebt. Diese wäre vor allem innerhalb der ersten Minuten des Anteigens interessant gewesen, aber schon allein bei diesem Versuchsaufbau aus oben genannten Gründen quantitativ nahezu unmöglich. Eine erschöpfenden Aufklärung über die Charakteristik der hier im Mehl des Tatarischen Buchweizens aktiven Flavonol-3-glucosidase nach Isolierung erfolgte bereits in 1.1.4 und ist ausführlicher in spezifischer Literatur zu finden (Suzuki et al., 2002; Suzuki et al., 2004).

Die Ergebnisse über die jeweiligen Rutin- bzw. Quercetingehalte während der Backversuche aus 3.2.2, verbildlicht in Abb. 16 und Abb. 17, erlauben den Schluss, dass beim Backen eine Abnahme der Quercetin- und Rutingehalte im verwendeten Mehl unvermeidbar ist. Laut Literatur nimmt der Gesamtflavonoidgehalt im Mehl des Echten Buchweizens bei 150 °C und einem Wassergehalt von nur 22 % nach 10 min um rund 20 %, nach 2 h 10 min um rund 37 % ab (Dietrych-Szostak & Oleszek, 1999). Ein Vergleich mit den Flavonolgehalten dieser Arbeit

ist eingeschränkt möglich, da hier Mehl des Tatarischen Buchweizens Verwendung fand und der Wassergehalt nach Anteigen 200 % betrug. Nach 10 min Behandlung waren hier erst 9 % des nach Anteigen dominierenden Flavonols Quercetin abgebaut. Berücksichtigt man den Vergleich mit der Literatur, lag dies vermutlich daran, dass die größere Wassermenge längere Zeit benötigte, um auf 150 °C erwärmt zu werden. Ein Abbau um 20 % war hier nach ca. 25 min eingetreten. Eine 37%ige Degradierung hingegen war wiederum entsprechend des größeren Wasseranteils schon nach ca. 45 min zu verzeichnen. Bei 250 °C waren 50 % des Quercetins nach ca. 18 min, bei 200 °C nach ca. 23 min abgebaut. Ein 50%iger Abbau Quercetins bei 150 °C trat nach rund 1 h ein. Letzterer Befund stützt indirekt die Literaturmeinung, Flavonoide seien relativ hitzestabil (Watzl und Leitzmann, 1999). Bei den nach Anteigen im ppm-Bereich befindlichen Rutingealte war hier eine Abnahme um 50 % bei 150 °C nach ca. 45 min, bei 200 °C nach ca. 20 min und bei 250 °C nach ca. 15 min erfolgt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Standardabweichungen kann man aussagen, die Stabilität Rutins verhält sich analog zu der von Quercetin. Unter den hier vorhandenen Bedingungen ist es zum Erhalt der physiologisch interessanten Flavonole Rutin und Quercetin von Vorteil, eine verhältnismäßig längere Backzeit bei niedrigerer Backtemperatur, also eher 150 °C bzw. niedriger als 200 °C einzuhalten.

Aufschluss über die Festlegung der Backzeit bei diesen Versuchen gibt die Darstellung der Flavonolgehalte im Mehl bei verschiedenen Temperaturen bezogen auf den Wassergehalt des verbackenen Modellteigs in Abb. 18 und Abb. 19. Allgemein zeigt diese Darstellung, dass bei vergleichbarem Wassergehalt die Quercetin- und Rutingealte in Proben von Backversuchen bei niedrigeren Temperaturen höher waren. Bei einem Wassergehalt von rund 35 bis 40 % und einer geringen Backtemperatur von 150 °C war der Quercetiningehalt mit ca. 45 bis 50 mg/kg Mehl nur um rund 16 % geringer als im Teig. Für den Rutiningehalt lässt sich aufgrund der Ungenauigkeiten im Spurenbereich keine eindeutige Aussage treffen. Diese Ergebnisse bekräftigen wiederum, dass ein längeres Backen bei niedrigeren Temperaturen den Quercetin- und Rutiningehalt nicht so stark mindert wie ein kürzeres Backen bei höheren Temperaturen. Weiterhin verdeutlichen die Abbildungen, dass bei abnehmendem Wassergehalt der Proben auch der Quercetin- und Rutiningehalt sank.

Tab. 10: Wassergehalte diverser Backwaren (Souci et. al., 2000)

<b>Backware</b>	<b>Wassergehalt, %</b>
Brötchen	29,5
Brot	35,0 – 45,0
Knäckebröt	6,2
Zwieback	8,5
Eierteigwaren	10,7
Keks	2,0
Tortenboden	17,8

In Tab. 10 sind Wassergehalte diverser Backwaren aus Weizenmehl aufgeführt. Will man eine dieser Backwaren mit Buchweizenmehl als Substituent für Weizenmehl herstellen und berücksichtigt dabei, dass bei den Backversuchen ein Wassergehalt von 35 bis 40 % einem Quercetinabbau von rund 16 % entspricht, deutet dies auf folgendes hin: Backwaren aus Buchweizenmehl mit höherem Wassergehalt wie beispielsweise Brot dürften höhere Rutin- und Quercetiningehalte enthalten als Backwaren mit einem geringeren Wassergehalt wie beispielsweise Keks oder Knäckebröt mit einem Wassergehalt von 6,2 % (Souci et al., 2000). Wobei in der entsprechenden theoretischen Buchweizenbackware auch hier immer noch rund 65 % des ursprünglichen Flavonolgehalts vorhanden wäre. Strebt man also die Formulierung eines funktionellen Lebensmittels aus Buchweizen- bzw. Lifago-Mehl mit möglichst hohen Gehalten an physiologisch interessanten Flavonolen an, lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, sich an einer großvolumigen Backware wie Brot mit hohem Wassergehalt zu orientieren.

### 4.3 Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase

Das Mehl der Samen der Tatarischen Buchweizensorte Lifago zeigte während der Behandlungen nach 2.2.8, also im wässrigen System, eine deutliche Flavonol-3-glucosidaseaktivität. Diese wurde ebenfalls von (Suzuki et al., 2002) beschrieben und führte zu einer nahezu kompletten Hydrolyse Rutins zum Produkt Quercetin unter Abspaltung des Rutinoserests. An diesem Punkt folgte das Postulat der hypothetischen Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase durch nasschemische Methoden, Mikrowellenbehandlung sowie Hitzebehandlung. U.a. zur

Einschätzung der Extraktionsausbeuten wurde in dieser Arbeit zunächst auf nasschemischen Wege erprobt, die Flavonol-3-glucosidase zu inaktivieren (vgl. auch 2.2.4). (Kreft et al., 2006)) haben beschrieben, die Extraktion von Rutin verlief bei Echtem Buchweizen mit 67 % Methanol am ertragreichsten. Allerdings wurde dort auch darauf hingewiesen, die Verwendung eines Lösungsmittels mit wässrigem Anteil könne durch Coextraktion von rutinabbauenden Enzymen zu einer verringerten Extraktionsausbeute von Rutin führen. Letzteres haben die Ergebnisse in 3.3.1 für den Tatarischen Buchweizen Lifago in vergleichbarer Weise widerspiegelt. Hier führte das Versetzen von Lifago-Mehl mit 60 % Methanol im Methanol/Wasser-Gemisch nach Extraktion und HPLC-Bestimmung zu einem nahezu kompletten Abbau von Rutin zu Quercetin. Dies wurde deutlich durch den sehr geringen Gehalt an Rutin im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe bei gleichzeitig hohen Quercetiningehalten, die für einen äquimolaren Umsatz von Rutin zu Quercetin sprachen. Die Flavonol-3-glucosidase zeigte entsprechend keine Hemmung in ihrer Aktivität. Auch 80 % Methanol inhibierte die Flavonol-3-glucosidase nur teilweise, was man durch die im Vergleich zur Rutin-positiv-Probe niedrigeren Gehalte an Rutin bei gleichzeitig relativ hohen Quercetiningehalten beobachten konnte. Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Behandlung mit Wasser verschiedener pH-Werte auf die anschließende Rutinextraktionsausbeute und damit auf die Flavonol-3-glucosidaseaktivität erprobt. Es stellte sich heraus, dass das Versetzen mit Wasser mit pH 1 für eine teilweise Inhibierung der Flavonol-3-glucosidase sorgte. Schließlich hat sich das Versetzen von Lifago-Mehl mit 100 % Methanol für die Extraktion von Rutin unter den in dieser Arbeit vorherrschenden Bedingungen am geeignetsten erwiesen.

Für die lebensmitteltechnologische Behandlung von Buchweizenmehl kommen die oben diskutierten Verfahrensweisen allerdings nicht in Frage, da sie mit lebensmittelrechtlichen Regelungen und nicht zuletzt mit den resultierenden sensorischen Eigenschaften in Konflikt geraten würden. Darum wurde eine Inhibierung der Flavonol-3-glucosidase im Lifago-Mehl durch Mikrowellenbehandlung nach 2.2.9.2 getestet. Diese verlief unter den genannten Bedingungen bei 900 W und 2450 MHz für 1, 2, und 3 min negativ. Es konnte keine für die Mikrowelleninaktivierung der Flavonol-3-glucosidase in Buchweizen spezifische Literatur gefunden werden. Vergleichbare Literatur behandelt die Einflüsse von Mikrowellen auf spezielle Enzymaktivitäten auch in Lebensmittelmatrizes. So berichteten (Devece et al., 1999) über eine komplette Inaktivierung der Polyphenoloxidase in Champignons nach zweiminütiger Mikrowellenbehandlung bei 700 W und 2450 MHz. Der Versuch von (Galvin et al., 1981) dagegen sowohl Acetylcholinesterase als auch eine Kreatinphosphokinase in ihren Aktivitäten durch



Mikrowellenbestrahlung bei 2450 MHz beeinflussen zu wollen schlug fehl. Es wird angenommen, dass der Erfolg einer Mikrowellenbehandlung zur Inhibierung von Enzymaktivitäten in großem Maß zum einen von der Charakteristik des entsprechenden Enzyms, zum anderen von der das Enzym umfassenden Matrix abhängt. Wobei die Eigenschaften letzterer, wie z.B. die Wasseraktivität oder eben der Gehalt an dipolaren Substanzen, einen starken Einfluss üben dürften. Für diese Arbeit kann also eine Mikrowellenbehandlung zur Inhibierung der Flavonol-3-glucosidase in Lifago-Mehl unter den beschriebenen Parametern als ungeeignet eingestuft werden.

In (Suzuki et al., 2004) wurde u.a. eine Methode zur Inhibierung der Flavonol-3-glucosidase vorgestellt. Das Mehl wurde dafür bei 85 °C für 24 h erhitzt. Diese Methode führte unter den Bedingungen in dieser Arbeit (siehe 2.2.9.3) zu einem nicht zufriedenstellenden Ergebnis (siehe 3.3.3). Erfolgreich war die hier angewendete Methode der Hitzebehandlung bei 150 °C für 24 h (siehe ebenfalls 3.3.3) auch unter Berücksichtigung der eventuellen negativen Beeinflussung des Rutingehalts. Rutin in Lifago-Mehl kann unter den Temperaturbedingungen als relativ stabil bezeichnet werden. Man kann festhalten, dass die Hitzebehandlung zur vollständigen Inhibierung der Flavonol-3-glucosidase in Lifago-Mehl eine adäquate Methode für den in dieser Arbeit folgenden Arbeitsschritt, der enzymatisch katalysierten Hydrolyse von Rutin zu Isoquercitrin, darstellte. Auch als lebensmitteltechnologisches Verfahren zur Mehlbehandlung ist eine solche Behandlung gemäß lebensmittelrechtlicher Reglements zulässig. Allerdings müssten zukünftig mögliche Einflüsse auf die übrigen Inhaltsstoffe im Mehl von Samen des Tatarischen Buchweizens näher untersucht werden. Und auch das Verhalten des behandelten Mehls in der lebensmitteltechnologischen Prozessierung bedarf einer genaueren Betrachtung (siehe unten).

Hier wurde die Viskosität des Teigs vor und nach obiger Hitzebehandlung des Lifago-Mehls als Parameter herangezogen. Die Viskosität des Teigs lässt Rückschlüsse auf die Backeigenschaften zu. Es zeigte sich (siehe 3.3.3.1), dass der Teig des hitzebehandelten Mehls keine bestimmbar viskosen Eigenschaften besaß, im Gegensatz zum Teig des unbehandelten Mehls mit ca. 505 mPa·s. Die Mehl-Wasser-Suspension mit hitzebehandeltem Mehl war instabil, so dass das Mehl eine schnelle Sedimentation zeigte. Es ließ sich somit keine stabile Viskosität auch nach einer Stunde Anteigzeit messen. Das bedeutet, das hitzebehandelte Mehl allein ist zum Backen ungeeignet. Die Hitzebehandlung nach 2.2.9.3 ist zwar für die Zwecke der Inhibierung der Flavonol-3-glucosidase erfolgreich, für eine anschließende lebensmittel-

technologische Prozessierung allerdings mangelhaft. Man muss also versuchen, eine schonendere Hitzeinaktivierung vorzunehmen. Die Temperatur von 150 °C und auch die Behandlung über 24 h lassen sich gegebenenfalls leicht reduzieren. Möglicherweise ist es vorteilhaft, statt mit trockener Hitze zu operieren, für Feuchte durch Wasserdampf während der Hitzebehandlung zu sorgen. Dies könnte allerdings schon die Flavonol-3-glucosidase aktivieren und zu unerwünschten Verlusten von Rutin führen. Andererseits wird zur Herstellung von Buchweizenprodukten selten mit reinem Buchweizenmehl angeteigt. Buchweizen bildet keinen Kleber und kann laut Literatur beispielsweise nur in Mischungen mit Weizenmehl bis zu 30 % zu Brot backen werden (Meyer, 1993). Vergleichbare Probleme bei der Behandlung von Buchweizenmehl hinsichtlich der Verbesserung der funktionellen Eigenschaften traten z.B. auch bei (Handoyo et al., 2006) auf. Dort war ein obligatorischer methodischer Schritt das Kochen von Buchweizengries für 45 min bei 100 °C und eine anschließende Behandlung mit *Rhizopus oligosporus*. Im Zuge der Behandlungen waren die sensorischen Eigenschaften des schließlich formulierten Produkts, Nudeln aus einem Gemisch aus Weizenmehl und Buchweizenmehl, umstritten. Positiv diskutiert wurden Mischungen der Mehle mit einem Buchweizenmehlanteil von 10 bis 30 % (Handoyo et al., 2006). Wiederum mit jener Studie vergleichbar hinsichtlich der Einschätzung eines sensorisch adäquaten Verhältnisses von Weizenmehl zu Buchweizenmehl waren die Folgerungen von (Di Cagno et al., 2005). Dort wurde mit einem Buchweizenmehl/Weizenmehl-Verhältnis von 3 zu 7 gearbeitet. Die Studie hatte zwar die Produktion von glutenfreier Pasta als Ziel, diskutierte aber die Verwendung der oben genannten Mehlmischungen auch für die Herstellung von Brot und anderen Produkten (Di Cagno et al., 2005). Man kann also durch ein geeignetes Verhältnis von Weizenmehl zu Buchweizenmehl weiterhin für angemessene Teigeigenschaften sorgen.

#### **4.4 Biochemische Überführung von Rutin in Isoquercitrin**

Nach Inaktivierung der Flavonol-3-glucosidase in Lifago-Mehl konnte der letzte Schritt, die enzymatisch katalysierte Überführung von Rutin in Isoquercitrin erfolgen. Dazu wurden die *Lb. rhamnosus* und *Lb. plantarum*-Stämme auf mögliche  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität getestet und deren Einsatz in der anschließenden Derivatisierung geprüft. Es wurde eine Fermentation von Rutin mit intakten Lactobacillenzellen sowie dessen Behandlung mit Zellextrakten der Teststämme durchgeführt. Vergleichend wurde die Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase vorgenommen.

Zunächst gaben Wachstumsversuche mit den Stämmen von *Lb. rhamnosus* (bzw. *Lb. casei* subsp. *rhamnosus*) und *Lb. plantarum* Aufschluss (siehe 3.4.1) über die notwendigen Bedingungen bei den anschließenden Fermentations- bzw. Inkubationsversuchen. Es zeigte sich zwar bei einigen Stämmen von *Lb. rhamnosus* und bei allen *Lb. plantarum*-Stämmen nicht die Fähigkeit, L-(+)-Rhamnose zu verwerten. Allerdings bestand bei diesen weiterhin die Möglichkeit, Enzyme exprimieren zu können, deren Seitenaktivitäten dem angestrebten Zweck dienlich sein könnten. So erhärteten (Watanabe et al., 1992) die Annahme, *Lb. casei* baue L-(+)-Rhamnose in die Polysaccharidfraktion der Peptidoglykanschicht seiner Zellwand ein. (Pham et al., 2000) berichteten, dass *Lb. rhamnosus* G ein breites Spektrum an Glykohydrolasen produzieren könne. Darunter waren neben  $\alpha$ -D-Glucosidase,  $\beta$ -D-Glucosidase,  $\alpha$ -D-Galactosidase,  $\beta$ -D-Galactosidase und  $\beta$ -D-Glucuronidase auch Spuren von  $\alpha$ -L-Rhamnosidase verzeichnet. Daten konnte die Arbeitsgruppe für die festgestellte schwache  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität allerdings nicht angeben. *Lb. plantarum* ist ebenfalls mutmaßlich zur Produktion einer  $\alpha$ -L-Rhamnosidase befähigt (Dept. of Bioinformatics, 2009). Weiterhin wurde bei den Stämmen beider Lactobacillenspezies keine lag-Phase in den statischen Kulturen beobachtet. Das bedeutet, für die Stämme, die L-(+)-Rhamnose verwerten konnten, musste keine Exprimierung der mutmaßlichen Rhamnosidase induziert werden, wie dies beispielsweise bei (Miake et al., 2000) der Fall war. Dort musste bei *Pseudomonas paucimobilis* FP2001 die Exprimierung einer intrazellularen  $\alpha$ -L-Rhamnosidase während der Kultivierung durch Zugabe von L-(+)-Rhamnose induziert werden. Auffällig bei den hier verwendeten Stämmen war, dass sowohl in MRS-Bouillon ohne Zucker als Kohlenstoffquelle als auch in dem mit 2 % (m/v) L-(+)-Rhamnose innerhalb der beobachteten Wachstumsdauer keine Absterbephase zu verzeichnen war. Die Stämme konnten möglicherweise Inhaltsstoffe des Peptons (siehe 2.1.6) verwerten.

Bevor die direkte Fermentation von Rutin gestartet werden konnte, wurden die Lactobacillen auf den Einfluss von Ethanol getestet. Ethanol diente als Lösungsmittel für Rutin in den mikrobiologischen Versuchen. Die Zugabe von Rutin zu den Fermentationsansätzen stellte also durch die resultierende Menge an Ethanol in den Ansätzen einen kritischen Punkt dar. Während z.B. Saccharomyceten, aber auch *Sarcina ventriculi*, *Zymomonas mobilis*, einige Enterobacteriaceen und Clostridien relativ ethanolresistente Organismen sind, ist dies bei Milchsäurebakterien (z.B. *Leuconostoc mesenteroides*) nur bedingt der Fall (Schlegel, 1992). Darum wurde hier ein Schnelltest zur Beobachtung des Einflusses von Ethanol auf die log-Phase der *Lb. rhamnosus*- und *Lb. plantarum*-Stämme nach 2.3.4 durchgeführt. Die in 3.4.2 dargestell-

ten Ergebnisse zeigten, dass die drei Stämme von *Lb. plantarum* bei einer resultierenden Ethanolkonzentration von bis zu 5 % und *Lb. rhamnosus* 92255, 92034 und GG (ATCC53103) von bis zu 9 % in den Ansätzen keine wesentliche Einschränkung ihres Wachstums während der log-Phase zeigten. Die Stämme *Lb. rhamnosus* 92278 und 92264 ließen aufgrund ihrer Agglutination im Medium keine Interpretation ihres Verhaltens gegenüber Ethanol zu. Zwecks Vergleichbarkeit der folgenden Fermentationsansätze wurde bei beiden Lactobacillenspezies mit einer resultierenden Ethanolkonzentration von bis zu 5 % operiert.

Die Fermentation von Rutin mit intakten Zellen der Stämme von *Lb. plantarum* und *Lb. rhamnosus* verlief unter den Testbedingungen negativ (siehe 3.4.3 und 2.3.5). Das heißt, die eingesetzten Lactobacillen waren nicht in der Lage, eine entsprechende Glykohydrolase sowohl in der log-Phase als auch in der während einer Inkubation von 24 h (und länger; siehe Fußnote zu 3.4.3) erreichten stationären Phase zu exprimieren. Eine kompetitive Hemmung durch die im MRS-Bouillon als Kohlenstoffquelle enthaltenen D-(+)-Glucose aufgrund ihrer Strukturverwandtschaft zur L-(+)-Rhamnose erscheint für die *Lb. plantarum*-Stämme relativ unwahrscheinlich. Diese Stämme ließen schon in den Wachstumsversuchen die Annahme zu, L-(+)-Rhamnose nicht auf vergleichbarem Weg wie D-(+)-Glucose ihrem Stoffwechsel verfügbar machen zu können. Eine kompetitive Hemmung durch D-(+)-Glucose kommt unter Umständen für die *Lb. rhamnosus*-Stämme in Frage, konnte aber bei einer Fermentation in MRS-Bouillon ohne Kohlenstoffquelle und ansonsten gleichen Bedingungen nicht bestätigt werden (siehe Fußnote zu 3.4.3). Es lag der Schluss nahe, bei den mutmaßlich produzierten Glykohydrolasen, speziell einer  $\alpha$ -L-Rhamnosidase, handele es sich nicht um extrazelluläre Enzyme. Diese Vermutung wurde z.B. für *Lb. rhamnosus* G von (Miake et al., 2000) bestätigt. Als Konsequenz wurden zellfreie Extrakte der Lactobacillenstämme eingesetzt (siehe 2.3.6).

Um die gewonnenen zellfreien Extrakte adäquat bewerten zu können, ist ein Testsystem zum Nachweis einer  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität etabliert worden (siehe 2.3.7). Die quantitativen Ergebnisse hieraus (siehe 3.4.4) täuschten unter Umständen eine Aktivität bei allen eingesetzten Lactobacillenstämmen vor. Es schienen in den Inkubationsansätzen eine Reihe Substanzen in den groben Enzymextrakten die photometrische Bestimmung des 4-Nitrophenols zu stören. Zur Vermeidung dieser Störung unter den angegebenen Bedingungen könnte man in Erwägung ziehen, das für die photometrische Messung eingesetzte Volumen der Inkubationslösungen in der  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung zu verringern. So würde u.a. der reflektierte Anteil der Intensität

des monochromatischen Lichts eliminiert werden, was mit der eigentlich dafür vorgesehenen Messung des Blindwerts möglicherweise nicht erreicht wurde (Maier, 1990). Eine solche Verdünnung war hier allerdings nicht möglich, da die Enzymextrakte nur eine schwache Aktivität zeigten. Weiterhin wäre es möglich die Proben für die Photometrie durch z.B. Flüssig-Flüssig-Extraktion aufzureinigen, wobei hier gegebenenfalls mit Verlusten an 4-Nitrophenol gerechnet werden müsste. Eine alternative Detektionsmethode in Kombination mit einer chromatographischen Auftrennung böte die HPLC an. Der Vorteil eines relativ preisgünstigen Schnelltests zum Aktivitätsnachweis ginge allerdings verloren. Dennoch wurde die HPLC eingesetzt, um die Inkubation der Enzymextrakte mit dem Metabolit Rutin hinsichtlich einer möglichen Hydrolyse der L-(+)-Rhamnose zu charakterisieren (siehe unten). Hier wird angenommen, dass nur die zellfreien Extrakte der Stämme eine  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität besitzen, bei denen eine deutliche Zunahme im Verlauf der Inkubation ermittelt worden war. Dafür ist es hilfreich, einen Schwellenwert bzw. eine Mindestgrenze für die aus den Messungen berechnete Aktivität festzulegen. Setzt man einen Schwellenwert von  $> 0,5 \mu\text{mol/g}$  voraus, zeigten *Lb. plantarum* 92260, 92265 und K<sub>4</sub>Lb6 nach 1000 min  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität. Eine abschließende Überprüfung der Fähigkeit zur Hydrolyse des  $\alpha$ -L-Rhamnoseresests lieferte die Inkubation von Rutin mit zellfreien Extrakten mit anschließender Prüfung mittels HPLC (siehe Abb. 41 und Abb. 42). Während die Extrakte von *Lb. rhamnosus* und *Lb. plantarum* 92260 sowie 92265 keine Aktivität zeigten, katalysierte der Enzymextrakt aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 die Hydrolyse von Rutin zu Isoquercitrin. Der Enzymextrakt aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 zeigte also eine deutliche, wenn auch schwache  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität. Da die Fermentationsansätze mit intakten Zellen negativ verlaufen waren, dürfte für die Aktivität ein intrazelluläres Enzym oder ein intrazellulärer Enzymkomplex verantwortlich sein.

Mit den zellfreien Enzymextrakten aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 und vergleichend mit denen von *Lb. plantarum* 92260 und *Lb. plantarum* 92265 wurde nun die Inkubation über einen längeren Zeitraum bei verschiedenen pH-Werten mit der Reinsubstanz Rutin als Substrat vollzogen. Die Derivatisierung von Rutin zu Isoquercitrin war hierbei jedoch nur eingeschränkt möglich (siehe 3.4.5). Die Chromatogramme in Abb. 43 zeigten, dass die Reaktion auch nach 60 Stunden Inkubation unvollständig und insgesamt eher zu Gunsten des Hydrolyseprodukts Quercetin verlief. Mit den Enzymextrakten aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 wurde im Mittel die höchste relative Ausbeute an Isoquercitrin von rund 25 % nach 16 h bei pH 5,5 erzielt (siehe Abb. 44). Im Vergleich zur relativen Ausbeute von 9 % nach 16 h bei pH 5,5 durch Enzymextrakte aus Kulturen desselben Stammes wurde gezeigt, dass man über die Variation des Parameters Aci-

dität der Pufferlösung bei der Inkubation deutlich unterschiedliche Ergebnisse erzielen konnte. Der Beitrag des Enzymextrakts von *Lb. plantarum* 92265 zur Umwandlung von Rutin in Isoquercitrin wird mit der höchsten relativen Ausbeute von rund 11 % nach 16 Stunden Inkubation und nur bei pH 5,5 als unwesentlich bewertet. Bei den Enzymextrakten von *Lb. plantarum* 92260 konnte keine relevante Bildung von Isoquercitrin durch  $\alpha$ -L-Rhamnosidasen verzeichnet werden. Unter den Testbedingungen stellte *Lb. plantarum* K4Lb6 den potentesten Stamm mit  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität oder einer entsprechenden Seitenaktivität der hier eingesetzten Lactobacillenstämme dar.\* Dennoch ist die relative Ausbeute als gering einzustufen.

Hesperidinase besitzt nachgewiesene  $\alpha$ -L-Rhamnosidase- und  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivitäten (EC 3.2.1.21). Das Enzym stellt somit eine vergleichende Alternative zum Enzymextrakt von *Lb. plantarum* K4Lb6 dar. Der Versuch der Hydrolyse von Rutin mit Hesperidinase (siehe 3.4.6 und Abb. 46) diente als Grundlage für die nachfolgende Behandlung von Buchweizenmehl mit Hesperidinase. Die sowohl qualitativ als auch quantitativ positiven Ergebnisse jener biochemischen Überführung von Rutin in Isoquercitrin (siehe 3.4.6) erleichterten die Festlegung der Bedingungen, vor allem des Inkubationszeitraums für einen entsprechenden Ansatz mit hitzebehandeltem Lifago-Mehl (siehe 3.4.7). Ein Vorteil war die gegenüber der  $\beta$ -D-Glucosidaseaktivität höhere  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivität beim Substrat Rutin. Der Verlauf der folgenden Reaktion war nun u.a. abhängig von der Verfügbarkeit Rutins im hitzebehandelten Mehl, welches wiederum während der Inkubation in einer Suspension vorlag. Die qualitativen Ergebnisse, dargestellt durch die Chromatogramme in Abb. 47, waren positiv. Rutin in Buchweizenmehl wurde enzymatisch in Isoquercitrin überführt. Quantitativ konnte bei den Testbedingungen eine Ausbeute an Isoquercitrin von rund 88 % nach zweistündiger Inkubation ermittelt werden. Gegenüber der Ausbeute von 77 % bei der Hydrolyse von Rutin als Reinsubstanz mit Hesperidinase, wird die enzymatische Derivatisierung in der pflanzlichen Matrix als erfolgreich beurteilt. Über 2 h Inkubation hinaus konnte zwar eine größer werdende Menge Quercetin in den Ansätzen ermittelt werden, die Reaktion verlief jedoch weiterhin zu Gunsten vom Hydrolyseprodukt Isoquercitrin. Ein ähnlicher Ansatz von (Sun et al., 2007)

---

\* Die hohe relative Ausbeute an Quercetin mit rund 88 % nach 60 h bzw. 60 % nach 40 h bei pH 5,5 macht *Lb. plantarum* K4Lb6 bzw. seinen Enzymextrakt interessant für die Steigerung der Bioverfügbarkeit der Flavonole, durch Umwandlung von Rutin zumindest zum Aglykon Quercetin, und gleichzeitiger Bittergeschmacksregulierung in Buchweizensorten mit geringer Flavonol-3-glucosidaseaktivität, also in Echtem Buchweizen.

zur Verbesserung der antioxidativen Kapazität von Spargelwasser wurde mit hitzbehandelter Pektinase (Sigma-Aldrich) aus *Aspergillus niger* durchgeführt. (Sun et al., 2007) berichten ebenfalls von einer erfolgreichen Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin. Allerdings wurde eine Ausbeute an Isoquercitrin von rund 50 % bei 37 °C und pH 5,8 erst nach 8 h erreicht. Die hier eingesetzte Hesperidinase erzielte eine entsprechende Ausbeute schon nach rund 50 min. Sie stellt somit ein adäquateres Mittel zur Gewinnung von Isoquercitrin dar. Die Befunde bedeuten schließlich, dass erstmalig Rutin in hitzebehandeltem Lifago-Mehl, also in Tatarischem Buchweizen, gezielt zum Monoglucosid Isoquercitrin umgewandelt werden konnte.

Vergleicht man die Aktivität der Hesperidinase mit dem Enzymextrakt von *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6, war die Hesperidinase um ein Vielfaches schneller beim Katalysieren der Hydrolyse. Der Zellextrakt aus rund 400 mg Nassgewicht intakter Zellen von *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 setzte erst nach 16 h rund 10 % Rutin zu Isoquercitrin um. Die Hesperidinase erzielte eine vergleichbare Ausbeute nach weniger als 5 min. Bezieht man ungefähr die eingesetzte Menge Hesperidinase (siehe 2.3.9 und auch 2.1.4) auf die Menge Nassgewicht Zellpellet, wäre die Hesperidinase rund  $4 \cdot 10^4$  effizienter als der Zellextrakt. Dieser enthielte im Rückschluss bezogen auf das Nassgewicht Zellpellet  $2,5 \cdot 10^{-3}$  %  $\alpha$ -L-Rhamnosidase.

## 4.5 Ausblick

Zusammenfassend kann man urteilen, dass Lifago als Sorte des Tatarischen Buchweizens unter Freilandbedingungen im norddeutschen Raum leicht kultivierbar und für den Einsatz als wertgebender Bestandteil in Lebensmitteln gut geeignet ist. Sowohl seine Samen als auch Blätter sind reich an physiologisch wertvollem Rutin. Außerdem fällt für die Blätter der Erntezeitpunkt mit den höchsten Gehalten an Rutin und Quercetin auf die Samenreife. Dies ist äußerst positiv, will man die Flavonole beider Pflanzenteile nutzen. Von Vorteil ist außerdem, dass man auf Stickstoffdüngung verzichten kann, kultiviert man Lifago hinsichtlich hoher Rutingehalte auch in Bezug auf die Sprossmasseerträge.

Die Behandlung von Teig aus Lifago-Mehl unter Berücksichtigung optimaler Rutin- und Quercetiningehalte beim Backprozess lässt sich bei den relativ hitzestabilen Flavonolen leicht kontrollieren. Hinsichtlich einer rutin- bzw. quercetinschonenden Zubereitung empfiehlt es sich, die Backdauer zu Gunsten einer niedrigen Temperatur zu verlängern, sowie großlaibige Produkte oder solche mit relativ hohem Wassergehalt, wie z.B. Brot zu wählen. Die Backware

Brot als Zielprodukt wurde auch durch die Ergebnisse der Hitzeinaktivierung der Flavonol-3-glucosidase im Lifago-Mehl postuliert. Diente die Behandlung erfolgreich der Unterbindung des enzymatischen Rutinabbaus im Mehl, war dadurch anschließend auf eine Benachteiligung der Backeigenschaften zu schließen. Diese könnten mit einem Weizen-/Buchweizenmehl-Gemisch z.B. im Verhältnis 70 zu 30 ausgeglichen werden. Glutenfreies Buchweizenmehl wird ohnehin für die Herstellung von Brot in diesem Mischungsverhältnis angeteigt (siehe 4.2).

Die enzymatische Umsetzung von Rutin zu Isoquercitrin wurde mit zellfreien Extrakten aus *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 vollzogen. Da es sich bei der  $\alpha$ -L-Rhamnosidase um ein intrazelluläres Enzym handelt, war eine direkte Fermentation von Rutin mit intakten Zellen nicht möglich. Die Behandlung von Buchweizenmehl unter Umsetzung des pflanzeigenen Rutins zu Isoquercitrin auch mit hohen Ausbeuten war mit Hesperidinase aus *Aspergillus niger* erfolgreich. Die dargestellten Methoden zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Flavonolen in Buchweizenmehl durch enzymatische Behandlungen könnten zukünftig variiert und optimiert werden (siehe 4.4). Man könnte die Kultivierung von *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 in größerem Maßstab vornehmen, um eine höhere Zellausbeute zu erzielen. Weiterhin sollten die Kultivierungsbedingungen für die Produktion der  $\alpha$ -L-Rhamnosidase verbessert werden. Es könnten verschiedene Medien und pH-Werte getestet werden. Man müsste herausfinden, in welchem Wachstumsstadium ein Maximum bei der Expression der  $\alpha$ -L-Rhamnosidase vorliegt. Als nächstes könnte man das Enzym isolieren und genauer charakterisieren. Dadurch ließen sich die Inkubationsbedingungen für eine maximale  $\alpha$ -L-Rhamnosidaseaktivitäten einstellen. Zusätzlich ist eine Charakterisierung der  $\beta$ -D-Glucosidase von Vorteil. Deren Aktivität lässt sich unter Umständen inhibieren, ähnlich wie es mit der  $\alpha$ -L-Rhamnosidase im Zellextrakt ohne ausgiebiges Waschen der geernteten Zellen geschah (siehe 3.4.4). Über vergleichbare inhibitorische Effekte durch Kohlenhydrate berichteten (Zverlov et al., 2000) bei einer  $\alpha$ -L-Rhamnosidase aus *Clostridium stercorarium*. Ferner wäre eine genetischen Analyse nach DNS-Isolierung und eine Klärung der Genexprimierung einer  $\alpha$ -L-Rhamnosidase möglich. Außerdem könnte man versuchen, die Bakterienzellen reversibel zu perforieren, um so Rutin in die Zelle zu transportieren. Dies würde einen Aufschluss der Zellen umgehen, was wiederum eine Fermentation mit intakten Zellen von *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 anstelle eines Zellaufschlusses zuließe. Doch schließlich wurde hier ein Beitrag zur Formulierung von funktionell aufgewerteten Lebens-



mitteln aus Buchweizen durch Verfügbarmachen des Quercetin-3-*O*-monoglucosids Isoquercitrin geleistet.

Eine alternative Anwendung der dargestellten Methoden ist der Einsatz in der industriellen biochemischen Synthese von Isoquercitrin. Das Monoglucosid wird zu kommerziellen Zwecken für den Chemikalienhandel (Roth) bisher direkt aus Lindenblüten extrahiert. In dieser Pflanze sind Gesamtgehalte an Quercetinderivaten von 38,28 mg/kg TS ermittelt worden (Pietta et al., 1993). Ein mögliches Vorgehen wäre die Hitzeinaktivierung der Flavonol-3-glucosidase in den Blättern des Tatarischen Buchweizens mit rund 750 mg/kg TS Rutin und Hydrolyse mit Hesperidinase, was zu einer Isoquercitrinausbeute von rund 80 % führen könnte. Anschließend folgt die Extraktion. Eine Auftrennung der Flavonole Rutin (liegt nach Umsetzung in Spuren vor), Quercetin (je nach Hydrolysebedingungen) und Isoquercitrin könnte mit präparativer HPLC oder High-Speed Countercurrent Chromatographie durchgeführt werden, evtl. mit vorheriger säulenchromatographischer Aufreinigung (XAD 7) von den übrigen mitextrahierten Substanzen. Investiert man in die sehr preisgünstige Hesperidinase könnte vermutlich Isoquercitrin in leicht erzielbar hohen Ausbeuten für den Chemikalienhandel und somit günstiger für die Forschung verfügbar gemacht werden können.

## Zusammenfassung

Rutin, das in Buchweizen dominierende Flavonoid, sowie sein Aglykon Quercetin sind aufgrund ihrer positiven gesundheitlichen Eigenschaften von starkem Interesse für die Formulierung von funktionellen Lebensmitteln aus Buchweizen. Dafür wurden für diese Arbeit genauere Daten über die Beeinflussung der Flavonolgehalte bei der Kultivierung sowie der Prozessierung von Buchweizenmehl erhoben. Weiterhin wurden enzymatische Behandlungen zur Steigerung der Bioverfügbarkeit der Flavonole untersucht. Tatarischer Buchweizen (*Fagopyrum tataricum* Gaertner) der Sorte Lifago sowie die Sorten Bamby, Hruszowska und Lileja des Echten Buchweizens (*Fagopyrum esculentum* Moench) wurden nach Kultivierung im schleswig-holsteinischen Raum auf ihre Gehalte an Rutin und Quercetin in Samen und Blättern mittels RP-HPLC untersucht. Es wurden die Einflüsse von Sorte, Stickstoffdüngung und Erntezeitpunkt auf die Rutin- und Quercetingealte ermittelt. Die höheren Rutingealte in Lifago als in den Sorten des Echten Buchweizens konnten mit 115 mg/kg TS in den Samen (40-88 mal höher) und 765 mg/kg TS in den Blättern (1,3-1,7 mal höher) verifiziert werden. Die sortenspezifisch höchsten Rutingealte in den Blättern wurden bei Bamby, Hruszowska und Lileja zum Zeitpunkt Blüte und bei Lifago zum Erntezeitpunkt der Samenreife ermittelt. Letztere Tatsache ist von hoher Praktikabilität, will man beide Rohstoffe hinsichtlich optimaler Gehalte an Rutin ernten. Eine Stickstoffdüngung von 120 kg N/ha zeigte keinen Einfluss auf die Gehalte aller Sorten. Ein Anteigen des Mehls aus geschälten Samen der Sorte Lifago führte zum nahezu kompletten Abbau von Rutin im wässrigen System durch die endogene Flavonol-3-glucosidase zum Produkt Quercetin. Das Aglykon sowie die nach Einstellung des Hydrolysegleichgewichts erhaltenen Spuren Rutins erwiesen sich bei der Prozessierung vom Buchweizenteig als relativ stabil. Jedoch war der Abbau von Rutin und Quercetin während des Backprozesses stark temperaturabhängig. Die Flavonol-3-glucosidase im Mehl ließ sich durch Behandlung mit trockener Hitze inaktivieren. Dieses war Voraussetzung für eine kontrollierte Umsetzung von Rutin zum Quercetin-3-O-glucosid Isoquercitrin mittels Milchsäurebakterien sowie Hesperidinase aus *Aspergillus niger*. Hier stellte sich unter den *Lactobacilli* der Zellextrakt aus *Lb. plantarum* K4Lb6 bei der Hydrolyse von Rutin mit einer relativen Ausbeute von 25 % Isoquercitrin als am geeignetsten heraus. Dessen  $\alpha$ -L-Rhamnosidase war eine intrazelluläre Hydrolase, so dass eine Fermentation mit intakten Zellen nicht möglich war. Mit Hesperidinase wurden wesentlich höhere Ausbeuten von 88 % bei der Inkubation mit hitzebehandeltem Lifago-Mehl erreicht.

## Summary

Rutin, the dominant flavonoid in buckwheat, as well as its aglycon quercetin are of great interest for the formulation of functional foods from buckwheat due to their positive health attributes. For this thesis, detailed data about influencing the flavonol content in the cultivation and processing of buckwheat flour were gathered. Additionally, enzymatic treatments for increasing the bioavailability of the flavonols were investigated. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertner) of the cultivar Lifago as well as the cultivars Bamby, Hruszowska and Lileja of the common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivated in the area of Schleswig-Holstein (northern Germany) were analyzed with regard to their contents of rutin and quercetin in both seeds and leaves with RP-HPLC.

The influences of cultivar, nitrogen fertilization and time of harvest on rutin and quercetin content were determined. Higher rutin content in Lifago than in the cultivars of common buckwheat could be verified with a mean content of 115 mg/kg DS in seeds (40-88 times higher) and 765 mg/kg DS in the leaves (1,3-1,7 times higher). Cultivar-specific rutin content in the leaves was highest during flowering in Bamby, Hruszowska and Lileja, for Lifago, the highest content was measured after seed ripening. This latter point is of high practicability with regard to the optimal harvest time for both seeds and leaves with respect to rutin content. Nitrogen fertilization of 120 kg N/ha did not show any influence on the flavonol content of all cultivars. A pasting of flour of Lifago seeds without hulls resulted in a nearly complete degradation of rutin to quercetin in the aqueous system by the endogenous flavonol-3-glucosidase. The aglycon as well as the traces of rutin remaining after reaching equilibrium of the hydrolysis proved to be relatively stable. However, the degradation of rutin and quercetin during the baking process was strongly dependent on temperature. Flavonol-3-glucosidase in the flour could be deactivated through treatment with arid heat. This was a prerequisite for a controlled hydrolysis of rutin to quercetin-3-*O*-glucoside with lactic acid bacteria as well as hesperidinase from *Aspergillus niger*. For this, among lactobacilli the cell extract from *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 proved to be most suitable in the hydrolysis of rutin with a relative yield of 25 % quercetin-3-*O*-glucoside. Though  $\alpha$ -L-rhamnosidase from *Lb. plantarum* K<sub>4</sub>Lb6 was an intracellular hydrolase, so that a fermentation with intact cells was not possible. Using hesperidinase, a considerably higher yield of 88 % could be achieved through the incubation with heat-treated Lifago flour.

---

## Literaturverzeichnis

- Afanas'ev, I.B., Ostrakhovitch, E.A., Mikhal'chik, E.V., Ibragimova, G.A. & Korkina, L.G. (2001). Enhancement of antioxidant and anti-inflammatory activities of bioflavonoid rutin by complexation with transition metals. *Biochemical Pharmacology*, 61, 677-684.
- Ahlenstiel, T., Burkhardt, G., Kohler, H. & Kuhlmann, M.K. (2006). Improved cold preservation of kidney tubular cells by means of adding bioflavonoids to organ preservation solutions. *Transplantation*, 81, 231-239.
- Aufhammer, W. (2000). *Pseudogetreidearten - Buchweizen, Reismelde und Amarant*. Eugen Ulmer: Stuttgart (Hohenheim).
- Barber, G.A. & Behrman, E.J. (1991). The Synthesis and Characterization of Uridine 5'-(Beta-L-Rhamnopyranosyl Diphosphate) and Its Role in the Enzymatic-Synthesis of Rutin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 288, 239-242.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. & Schieberle, P. (2001). *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York.
- Beyer, H. & Walter, W. (1991). *Lehrbuch der Organischen Chemie*. Hirzel Verlag: Stuttgart.
- Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H.L. & Winter, J. (1987). Hydrolysis of Dietary Flavonoid Glycosides by Strains of Intestinal Bacteroides from Humans. *Biochemical Journal*, 248, 953-956.
- Bryant, J.P., Chapin, F.S. & Klein, D.R. (1983). Carbon Nutrient Balance of Boreal Plants in Relation to Vertebrate Herbivory. *Oikos*, 40, 357-368.
- Christa, K. & Soral-Smietana, M. (2008). Buckwheat grains and buckwheat products - Nutritional and prophylactic value of their components - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, 153-162.
- Defrancisci, M.L.P., Salgado, J.M. & Leitao, R.F.F. (1994). Chemical, Nutritional and Technological Characteristics of Buckwheat and Non-Prolamine Buckwheat Flours in Comparison of Wheat-Flour. *Plant Foods for Human Nutrition*, 46, 323-329.

- Degenhardt, A., Engelhardt, U.H., Wendt, A.S. & Winterhalter, P. (2000). Isolation of black tea pigments using high-speed countercurrent chromatography and studies on properties of black tea polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5200-5205.
- Dept. of Bioinformatics, T.B. (2009). BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System. TU Braunschweig: Braunschweig.
- Devece, C., Rodriguez-Lopez, J.N., Fenoll, L.G., Tudela, J., Catala, J.M., de los Reyes, E. & Garcia-Canovas, F. (1999). Enzyme inactivation analysis for industrial blanching applications: Comparison of microwave, conventional, and combination heat treatments on mushroom polyphenoloxidase activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4506-4511.
- DGE. (2008). Ernährungsbericht: Bonn.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Alfonsi, G., De Vincenzi, M., Silano, M., Vincentini, O. & Gobbetti, M. (2005). Pasta made from durum wheat semolina fermented with selected lactobacilli as a tool for a potential decrease of the gluten intolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4393-4402.
- Dietrych-Szostak, D. & Oleszek, W. (1999). Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4384-4387.
- Fabjan, N., Rode, J., Kosir, I.J., Wang, Z.H., Zhang, Z. & Kreft, I. (2003). Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) as a source of dietary rutin and quercitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6452-6455.
- Gallego, M.V., Pinaga, F., Ramon, D. & Valles, S. (2001). Purification and characterization of an alpha-L-rhamnosidase from *Aspergillus terreus* of interest in winemaking. *Journal of Food Science*, 66, 204-209.
- Galvin, M.J., Parks, D.L. & McRee, D.I. (1981). Influence of 2.45-Ghz Microwave-Radiation on Enzyme-Activity. *Radiation and Environmental Biophysics*, 19, 149-156.
- Goeritz, M., Kawiani, R., Loges, R., Schwarz, K., Kämper, M., Ehmsen, T. & Taube, F. (2009). Ertragsleistung und Rutingehalte verschiedener Buchweizensorten unter ökologischen Anbaubedingungen. In 10. Wissenschaftstagung Ökologischer Landbau pp. 215-219: Zürich.

- 
- Gonzalez-Barrio, R., Trindade, L.M., Manzanares, P., De Graaff, L.H., Tomas-Barberan, F.A. & Espin, J.C. (2004). Production of bioavailable flavonoid glucosides in fruit juices and green tea by use of fungal  $\alpha$ -L-rhamnosidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6136-6142.
- Guo, R., Wei, P. & Liu, W.Y. (2007). Combined antioxidant effects of rutin and vitamin C in Triton X-100 micelles. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 1580-1586.
- Handoyo, T., Maeda, T., Urisu, A., Adachi, T. & Morita, N. (2006). Hypoallergenic buckwheat flour preparation by *Rhizopus oligosporus* and its application to soba noodle. *Food Research International*, 39, 598-605.
- Harborne, J.B. & Mabry, T.J. (1988). *The Flavonoids: Advances in research*. Chapman & Hall, London.
- Harborne, J.B., Mabry, T.J. & Mabry, H. (1975). *The Flavonoids*. Chapman & Hall: London.
- Hashimoto, W. & Murata, K. (1998).  $\alpha$ -L-rhamnosidase of *Sphingomonas* sp. R1 producing an unusual exopolysaccharide of sphingan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 1068-1074.
- Heldt, H.-W. (2008). *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Akademischer Verlag: Heildelberg.
- Herms, D.A. & Mattson, W.J. (1992). The Dilemma of Plants - to Grow or Defend. *Quarterly Review of Biology*, 67, 283-335.
- Herrmann, K. (1988). On the Occurrence of Flavonol and Flavone Glycosides in Vegetables. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, 186, 1-5.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. & Kromhout, D. (1993a). Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart-Disease - the Zutphen Elderly Study. *Lancet*, 342, 1007-1011.
- Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M. & Kromhout, D. (1997). Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *Lancet*, 349, 699-699.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Katan, M.B. (1992a). Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of 28 Vegetables and 9 Fruits Commonly Consumed in the Netherlands. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.

- 
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Vandeputte, B. (1993b). Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 1242-1246.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. & Venema, D.P. (1992b). Optimization of a Quantitative Hplc Determination of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids in Vegetables and Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598.
- Hinneburg, I., Kempe, S., Ruttinger, H.H. & Neubert, R.H.H. (2006). Antioxidant and photoprotective properties of an extract from buckwheat herb (*Fagopyrum esculentum* MOENCH). *Pharmazie*, 61, 237-240.
- Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J. & Vavreinova, S. (2002). Buckwheat - the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Research International*, 35, 207-211.
- Hollman, P.C.H. (2004). Absorption, bioavailability, and metabolism of flavonoids. *Pharmaceutical Biology*, 42, 74-83.
- Hu, M. (2007). Commentary: Bioavailability of flavonoids and polyphenols: Call to arms. *Molecular Pharmaceutics*, 4, 803-806.
- Hubbard, G.P., Stevens, J.M., Cicmil, M., Sage, T., Jordan, P.A., Williams, C.M., Lovegrove, J.A. & Gibbins, J.M. (2003). Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components, of the glycoprotein VI signaling pathway. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1, 1079-1088.
- Jiang, P., Burczynski, F., Campbell, C., Pierce, G., Austria, J.A. & Briggs, C.J. (2007). Rutin and flavonoid contents in three buckwheat species *Fagopyrum esculentum*, *F-tataricum*, and *F-homotropicum* and their protective effects against lipid peroxidation. *Food Research International*, 40, 356-364.
- Kahraman, A., Erkasap, N., Koken, T., Serteser, M., Aktepe, F. & Erkasap, S. (2003). The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. *Toxicology*, 183, 133-142.
- Kalinova, J., Triska, J. & Vrchotova, N. (2006). Distribution of vitamin E, squalene, epicatechin, and rutin in common buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5330-5335.

- 
- Kamalakkannan, N. & Prince, P.S.M. (2006). Antihyperglycaemic and antioxidant effect of rutin, a polyphenolic flavonoid, in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98, 97-103.
- Kaneko, M., Takimoto, H., Sugiyama, T., Seki, Y., Kawaguchi, K. & Kumazawa, Y. (2008). Suppressive Effects of the Flavonoids Quercetin and Luteolin on the Accumulation of Lipid Rafts after Signal Transduction via Receptors. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 30, 867-882.
- Karlson, P. (1980). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie: für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Thieme: Stuttgart.
- Kawa, J.M., Taylor, C.G. & Przybylski, R. (2003). Buckwheat concentrate reduces serum glucose in streptozotocin-diabetic rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7287-7291.
- Kim, C.D., Lee, W.K., No, K.O., Park, S.K., Lee, M.H., Lim, S.R. & Roh, S.S. (2003). Anti-allergic action of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain extract. *International Immunopharmacology*, 3, 129-136.
- Krämer, J. (2002). *Lebensmittel-Mikrobiologie*. Eugen Ulmer: Stuttgart (Hohenheim).
- Kreft, I., Fabjan, N. & Yasumoto, K. (2006). Rutin content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) food materials and products. *Food Chemistry*, 98, 508-512.
- Kreft, S., Knapp, M. & Kreft, I. (1999). Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4649-4652.
- Kreft, S., Strukelj, B., Gaberscik, A. & Kreft, I. (2002). Rutin in buckwheat herbs grown at different UV-B radiation levels: comparison of two UV spectrophotometric and an HPLC method. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1801-1804.
- Kuhlmann, H. (1998). Botanik. In *Buchweizen: Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik, Pharmakologie, Toxikologie, Klinik*, Müller, A. & Schiebel-Schlosser, G. (eds) pp. 11-18. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart (Hohenheim).



- 
- La Casa, C., Villegas, I., de la Lastra, C.A., Motilva, V. & Calero, M.J.M. (2000). Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *Journal of Ethnopharmacology*, 71, 45-53.
- Lesser, S., Cermak, R. & Wolffram, S. (2006). The fatty acid pattern of dietary fat influences the oral bioavailability of the flavonol quercetin in pigs. *British Journal of Nutrition*, 96, 1047-1052.
- Maier, H.G. (1990). *Lebensmittel- und Umweltanalytik*. Steinkopff Verlag: Darmstadt.
- Meyer, A.H. (2009). *Lebensmittelrecht - Textsammlung*. Vol. 110. Ergänzungslieferung, Januar 2009. Verlag C.H. Beck: München.
- Meyer, D. (1993). Rohstoffqualität und Sorteneigenschaften. In *Spelz- und Schälgetreide*, Seibel, W. & Steller, W. (eds) pp. 43-53. Behr's Verlag: Hamburg.
- Miake, F., Satho, T., Takesue, H., Yanagida, F., Kashige, N. & Watanabe, K. (2000). Purification and characterization of intracellular alpha-L-rhamnosidase from *Pseudomonas paucimobilis* FP2001. *Archives of Microbiology*, 173, 65-70.
- Mogren, L.M., Olsson, M.E. & Gertsson, U.E. (2006). Quercetin content in field-cured onions (*Allium cepa* L.): Effects of cultivar, lifting time, and nitrogen fertilizer level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6185-6191.
- Mohr, H. (1969). In *The physiology of plant growth and development*, Wilkins, M.B. (ed) pp. 509. McGraw-Hill: London.
- Mojzis, J., Hviscova, K., Germanova, D., Bukovicova, D. & Mirossay, L. (2001). Protective effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats. *Physiological Research*, 50, 501-506.
- Molloy, C., Cannon, R.D., Sullivan, P.A. & Shepherd, M.G. (1994). Purification and Characterization of 2 Forms of N-Acetylglucosaminidase from *Candida-Albicans* Showing Widely Different Outer Chain Glycosylation. *Microbiology-Uk*, 140, 1543-1553.
- Morand, C., Manach, C., Crespy, V. & Remesy, C. (2000). Quercetin 3-O-beta-glucoside is better absorbed than other quercetin forms and is not present in rat plasma. *Free Radical Research*, 33, 667-+.

- Ohsawa, R. & Tsutsumi, T. (1995). Inter-varietal variations of rutin content in common buckwheat flour (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Euphytica*, 86, 183-189.
- Oomah, B.D. & Mazza, G. (1996). Flavonoids and antioxidative activities in buckwheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 1746-1750.
- Pahlow, M. (2000). *Das große Buch der Heilpflanzen: gesund durch die Heilkräfte der Natur*. Bechtermünz: Augsburg.
- Park, H.J., Lee, C.M., Jung, I.D., Lee, J.S., Jeong, Y.I., Chang, J.H., Chun, S.H., Kim, M.J., Choi, I.W., Ahn, S.C., Shin, Y.K., Yeom, S.R. & Park, Y.M. (2009). Quercetin regulates Th1/Th2 balance in a murine model of asthma. *International Immunopharmacology*, 9, 261-267.
- Pham, P.L., Dupont, I., Roy, D., Lapointe, G. & Cerning, J. (2000). Production of exopolysaccharide by *Lactobacillus rhamnosus* R and analysis of its enzymatic degradation during prolonged fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2302-2310.
- Pietta, P., Mauri, P., Bruno, A. & Zini, L. (1993). High-Performance Liquid-Chromatography and Micellar Electrokinetic Chromatography of Flavonol Glycosides from *Tilia*. *Journal of Chromatography*, 638, 357-361.
- Prince, P.S.M. & Kamalakkannan, N. (2006). Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 20, 96-102.
- Puri, M. & Kalra, S. (2005). Purification and characterization of naringinase from a newly isolated strain of *Aspergillus niger* 1344 for the transformation of flavonoids. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 21, 753-758.
- Qian, J.Y., Mayer, D. & Kuhn, M. (1999). Flavonoids in fine buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Monch) flour and their free radical scavenging activities. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 95, 343-349.
- Quettier-Deleu, C., Gressier, B., Vasseur, J., Dine, T., Brunet, C., Luyckx, M., Cazin, M., Cazin, J.C., Bailleul, F. & Trotin, F. (2000). Phenolic compounds and antioxidant activities of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls and flour. *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 35-42.

- 
- Rahman, I. & Adcock, I.M. (2006). Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *European Respiratory Journal*, 28, 219-242.
- Romero, C., Manjon, A., Bastida, J. & Iborra, J.L. (1985). A Method for Assaying the Rhamnosidase Activity of Naringinase. *Analytical Biochemistry*, 149, 566-571.
- Römpp. (1995). *CD Chemie Lexikon*. Georg Thieme: Stuttgart/ New York.
- Sanchez, M.A., Romero, C., Manjon, A. & Iborra, J.L. (1987). Activity of Soluble and Immobilized Hesperidinase on Insoluble Hesperidin. *Biotechnology Letters*, 9, 871-874.
- Schlegel, H.G. (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme: Stuttgart.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L.R., Gardner, P.T., Heinonen, M.I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L.H. & Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *European Food Research and Technology*, 212, 319-328.
- Siegelmann, H.W. (1964). In *Biochemistry of phenolic compounds*, Harborne, J.B. (ed) pp. 437. Academic Press: London, New York.
- Siegelmann, H.W. (1969). In *the physiology of plant growth and development*, Wilkins, M.B. (ed) pp. 489. McGraw-Hill: London.
- Souci, S.W., Fachmann, W. & Kraut, H. (2000). *Die Zusammensetzung der Lebensmittel: Nährwert-Tabellen*. Medpharm Scientific Publishers: Stuttgart.
- Steadman, K.J., Burgoon, M.S., Lewis, B.A., Edwardson, S.E. & Obendorf, R.L. (2001). Minerals, phytic acid, tannin and rutin in buckwheat seed milling fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 1094-1100.
- Sun, T., Powers, J.R. & Tang, J.M. (2007). Enzyme-catalyzed change of antioxidants content and antioxidant activity of asparagus juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 56-60.
- Suzuki, T., Honda, Y., Funatsuki, W. & Nakatsuka, K. (2002). Purification and characterization of flavonol 3-glucosidase, and its activity during ripening in tartary buckwheat seeds. *Plant Science*, 163, 417-423.

- Suzuki, T., Honda, Y., Funatsuki, W. & Nakatsuka, K. (2004). In-gel detection and study of the role of flavon 3-glucosidase in the bitter taste generation in tartary buckwheat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1691-1694.
- Theurer, C. (1998). Anatomie und Morphologie. In *Buchweizen: Botanik, Inhaltsstoffe, Analytik, Pharmakologie, Toxikologie, Klinik*, Müller, A. & Schiebel-Schlosser, G. (eds) pp. 19-26. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft: Stuttgart (Hohneheim).
- Walle, T. (2004). Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 829-837.
- Watanabe, K., Nakashima, Y. & Kamiya, S. (1992). Effects of Some L-Rhamnosyl Derivatives on the Adsorption of Phage Pl-1 to the Host *Lactobacillus-Casei*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56, 346-346.
- Watanabe, M. (1998). Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 839-845.
- Watanabe, M., Ohshita, Y. & Tsushida, T. (1997). Antioxidant compounds from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) hulls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1039-1044.
- Watzl, B. & Leitzmann, C. (1999). *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Vol. 2., überarbeitete und erweiterte Auflage. Hippokrates-Verlag: Stuttgart.
- WHO. (2008). *Atlas of health in Europe*, 2. Edition: Denmark.
- Williamson, G., Plumb, G.W., Uda, Y., Price, K.R. & Rhodes, M.J.C. (1996). Dietary quercetin glycosides: Antioxidant activity and induction of the anticarcinogenic phase II marker enzyme quinone reductase in Hepalclc7 cells. *Carcinogenesis*, 17, 2385-2387.
- Wolffram, S., Block, M. & Ader, P. (2002). Quercetin-3-glucoside is transported by the glucose carrier SGLT1 across the brush border membrane of rat small intestine. *Journal of Nutrition*, 132, 630-635.
- Yang, J. & Liu, R.H. (2009). Induction of phase II enzyme, quinone reductase, in murine hepatoma cells in vitro by grape extracts and selected phytochemicals. *Food Chemistry*, 114, 898-904.

- Yasuda, T. & Nakagawa, H. (1994). Purification and Characterization of the Rutin-Degrading Enzymes in Tartary Buckwheat Seeds. *Phytochemistry*, 37, 133-136.
- Young, N.M., Johnston, R.A.Z. & Richards, J.C. (1989). Purification of the Alpha-L-Rhamnosidase of *Penicillium-Decumbens* and Characterization of 2 Glycopeptide Components. *Carbohydrate Research*, 191, 53-62.
- Zeller, F.J. & Hsam, S.L.K. (2004). Funktionelles Lebensmittel Buchweizen - die vergessene Kulturpflanze. In *Biologie unserer Zeit*, Vol. 34. pp. 24-31.
- Zverlov, V.V., Hertel, C., Bronnenmeier, K., Hroch, A., Kellermann, J. & Schwarz, W.H. (2000). The thermostable alpha-L-rhamnosidase RamA of *Clostridium stercorarium*: biochemical characterization and primary structure of a bacterial alpha-L-rhamnoside hydrolase, a new type of inverting glycoside hydrolase. *Molecular Microbiology*, 35, 173-179.

## Anhang

### I. Anbaubegleitende Gehaltsbestimmungen in Buchweizensamen

Tab. 11: Rohdaten der Gehaltsbestimmungen in Buchweizensamen mittels HPLC

Sorte	N-Düngung <sup>1</sup>	Wdh. <sup>2</sup>	Gehalt, mg/kg TS (n = 2)	
			Rutin	Quercetin
Bamby	0 kg N/ha	1	1,69 ± 0,04 <sup>3</sup>	n.b. <sup>4</sup>
		2	1,71 ± 0,24	n.b.
		3	0,86 ± 0,01	n.b.
	120 kg N/ha	1	4,88 ± 0,15	0,07 ± 0,02
		2	1,10 ± 0,06	n.b.
		3	0,90 ± 0,01	0,05 ± 0,00
	0 kg N/ha	1	1,00 ± 0,01	n.b.
		2	1,47 ± 0,02	0,05 ± 0,00
		3	1,25 ± 0,01	n.b.
Hruszowska	120 kg N/ha	1	1,05 ± 0,01	n.b.
		2	1,43 ± 0,01	n.b.
		3	6,19 ± 0,73	0,05 ± 0,01
	0 kg N/ha	1	117,09 ± 0,29	n.b.
		2	109,78 ± 1,14	n.b.
		3	119,07 ± 2,01	n.b.
	120 kg N/ha	1	115,70 ± 1,98	n.b.
		2	110,08 ± 1,26	n.b.
		3	115,45 ± 1,10	n.b.
Lifago	0 kg N/ha	1	117,09 ± 0,29	n.b.
		2	109,78 ± 1,14	n.b.
		3	119,07 ± 2,01	n.b.
	120 kg N/ha	1	115,70 ± 1,98	n.b.
		2	110,08 ± 1,26	n.b.
		3	115,45 ± 1,10	n.b.
	0 kg N/ha	1	117,09 ± 0,29	n.b.
		2	109,78 ± 1,14	n.b.
		3	119,07 ± 2,01	n.b.

Fortsetzung Tab. 11

Sorte	N-Düngung <sup>1</sup>	Wdh. <sup>2</sup>	Gehalt, mg/kg TS (n = 2)	
			Rutin	Quercetin
Lileja	0 kg N/ha	1	1,53 ± 0,03 <sup>3</sup>	0,05 ± 0,00
		2	0,95 ± 0,01	n.b. <sup>4</sup>
		3	1,38 ± 0,01	n.b.
	120 kg N/ha	1	9,51 ± 0,12	0,35 ± 0,02
		2	16,89 ± 0,19	1,01 ± 0,13
		3	5,19 ± 0,09	0,12 ± 0,00

<sup>1</sup> Stickstoffdüngung, <sup>2</sup> Wiederholung, <sup>3</sup> mittlere Abweichung, <sup>4</sup> nicht bestimmbar  
 (Quercetin: Bestimmungsgrenze 4 µg/mL, Erfassungsgrenze 2 µg/mL, Nachweisgrenze 1 µg/mL; Rutin: Bestimmungsgrenze 6 µg/mL, Erfassungsgrenze 3 µg/mL, Nachweisgrenze 2 µg/mL; ermittelt mit DINTEST 2005 DE Demoversion)

## II. Anbaubegleitende Gehaltsbestimmungen in Buchweizenblättern

Tab. 12: Rohdaten der Gehaltsbestimmungen in Buchweizenblättern von 2007 mittels HPLC

Sorte	Erntezeitpunkt	N-Düngung <sup>1</sup>	Wdh. <sup>2</sup>	Gehalt, mg/kg TS (n = 2)	
				Rutin	Quercetin
Bamby	Vorblüte	0 kg N/ha	1	541,70 ± 4,83 <sup>3</sup>	5,09 ± 0,18
			2	595,77 ± 7,30	6,33 ± 0,17
		120 kg N/ha	1	575,81 ± 5,27	4,91 ± 0,13
			2	485,85 ± 5,65	5,96 ± 0,27
	Blüte	0 kg N/ha	1	369,95 ± 15,83	4,44 ± 0,23
			2	506,53 ± 18,18	6,82 ± 0,18
		120 kg N/ha	1	434,82 ± 3,78	10,64 ± 0,37
			2	383,22 ± 12,03	11,68 ± 0,28
	Samenreife	0 kg N/ha	1	408,92 ± 2,22	6,02 ± 0,08
			2	320,93 ± 8,95	10,02 ± 0,52
		120 kg N/ha	1	309,83 ± 4,32	7,41 ± 0,20
			2	246,36 ± 8,42	5,13 ± 0,20
Hruszowska	Vorblüte	0 kg N/ha	1	611,16 ± 1,03	4,89 ± 0,33
			2	589,82 ± 5,01	4,77 ± 0,22
		120 kg N/ha	1	491,71 ± 1,47	4,74 ± 0,06
			2	488,55 ± 5,75	5,32 ± 0,10
	Blüte	0 kg N/ha	1	547,77 ± 16,16	9,04 ± 0,28
			2	641,51 ± 5,60	4,93 ± 0,19
		120 kg N/ha	1	472,30 ± 3,73	12,45 ± 0,35
			2	521,83 ± 2,42	8,35 ± 0,17
	Samenreife	0 kg N/ha	1	615,91 ± 16,78	5,24 ± 0,47
			2	467,11 ± 10,48	7,78 ± 0,48
		120 kg N/ha	1	541,29 ± 1,15	5,11 ± 0,66
			2	391,31 ± 8,15	4,57 ± 0,37



Fortsetzung Tab. 12

Sorte	Erntezeitpunkt	N-Düngung <sup>1</sup>	Wdh. <sup>2</sup>	Gehalt, mg/kg TS (n = 2)	
				Rutin	Quercetin
Lifago	Vorblüte	0 kg N/ha	1	871,02 ± 21,35 <sup>3</sup>	5,89 ± 0,29
			2	919,92 ± 21,02	17,69 ± 1,06
		120 kg N/ha	1	739,61 ± 17,13	4,27 ± 0,10
			2	667,97 ± 2,88	4,38 ± 0,06
	Blüte	0 kg N/ha	1	794,11 ± 20,51	20,61 ± 1,64
			2	782,07 ± 4,33	18,34 ± 0,11
		120 kg N/ha	1	803,41 ± 6,73	12,51 ± 0,19
			2	787,67 ± 48,63	11,45 ± 0,77
	Samenreife	0 kg N/ha	1	696,87 ± 23,88	17,25 ± 1,44
			2	685,77 ± 3,34	9,63 ± 0,05
		120 kg N/ha	1	628,54 ± 45,08	9,94 ± 0,43
			2	900,79 ± 22,46	8,65 ± 0,04
Lileja	Vorblüte	0 kg N/ha	1	582,93 ± 3,09	5,17 ± 0,73
			2	582,06 ± 4,78	3,98 ± 0,14
		120 kg N/ha	1	528,24 ± 4,07	6,82 ± 0,20
			2	435,85 ± 11,69	8,31 ± 0,19
	Blüte	0 kg N/ha	1	578,58 ± 10,08	7,03 ± 0,03
			2	670,24 ± 20,58	6,91 ± 0,27
		120 kg N/ha	1	492,74 ± 8,91	9,36 ± 0,02
			2	509,75 ± 17,35	9,29 ± 0,26
	Samenreife	0 kg N/ha	1	330,37 ± 15,27	7,87 ± 0,13
			2	403,18 ± 8,51	2,35 ± 0,27
		120 kg N/ha	1	448,01 ± 8,89	5,57 ± 0,22
			2	513,92 ± 20,83	3,62 ± 0,30

<sup>1</sup> Stickstoffdüngung, <sup>2</sup> Wiederholung, <sup>3</sup> mittlere Abweichung

Tab. 13: Rohdaten der Gehaltsbestimmungen in Buchweizenblättern von 2008 mittels HPLC

Sorte	Erntezeitpunkt	N-Düngung <sup>1</sup>	Wdh. <sup>2</sup>	Gehalt, mg/kg TS (n = 2)	
				Rutin	Quercetin
Bamby	Vorblüte	0 kg N/ha	1	463,40 ± 2,15 <sup>3</sup>	n.b. <sup>4</sup>
			2	530,82 ± 21,53	n.b.
		120 kg N/ha	1	460,75 ± 7,23	n.b.
			2	568,73 ± 3,45	0,92 ± 0,06
	Blüte	0 kg N/ha	1	508,39 ± 11,06	1,94 ± 0,27
			2	507,48 ± 1,90	0,79 ± 0,02
		120 kg N/ha	1	568,96 ± 6,53	0,93 ± 0,05
			2	526,55 ± 2,05	0,94 ± 0,10
	Samenreife	0 kg N/ha	1	365,05 ± 1,89	n.b.
			2	463,90 ± 31,13	n.b.
		120 kg N/ha	1	331,87 ± 13,19	1,22 ± 0,08
			2	363,11 ± 12,46	n.b.
Hruszowska	Vorblüte	0 kg N/ha	1	605,24 ± 2,43	0,78 ± 0,02
			2	531,05 ± 8,93	0,67 ± 0,05
		120 kg N/ha	1	548,84 ± 10,79	n.b.
			2	498,67 ± 22,95	n.b.
	Blüte	0 kg N/ha	1	640,79 ± 9,91	0,80 ± 0,10
			2	555,54 ± 15,59	n.b.
		120 kg N/ha	1	505,89 ± 3,21	n.b.
			2	579,63 ± 5,34	1,14 ± 0,05
	Samenreife	0 kg N/ha	1	579,25 ± 17,92	1,27 ± 0,16
			2	568,74 ± 15,43	1,13 ± 0,17
		120 kg N/ha	1	490,55 ± 2,16	n.b.
			2	320,82 ± 12,47	n.b.

Fortsetzung Tab. 13

Sorte	Erntezeitpunkt	N-Düngung <sup>1</sup>	Wdh. <sup>2</sup>	Gehalt, mg/kg TS (n = 2)	
				Rutin	Quercetin
Lifago	Vorblüte	0 kg N/ha	1	603,01 ± 8,42 <sup>3</sup>	n.b. <sup>4</sup>
			2	688,75 ± 14,63	n.b.
		120 kg N/ha	1	505,24 ± 2,89	0,88 ± 0,12
			2	617,07 ± 5,30	1,18 ± 0,09
	Blüte	0 kg N/ha	1	688,71 ± 54,80	n.b.
			2	855,23 ± 21,87	n.b.
		120 kg N/ha	1	469,01 ± 13,88	n.b.
			2	675,97 ± 19,93	n.b.
	Samenreife	0 kg N/ha	1	903,01 ± 6,49	9,06 ± 1,33
			2	690,67 ± 3,31	3,47 ± 0,21
		120 kg N/ha	1	836,59 ± 47,98	7,05 ± 1,25
			2	636,16 ± 7,18	1,27 ± 0,16
Lileja	Vorblüte	0 kg N/ha	1	574,14 ± 9,57	0,75 ± 0,01
			2	548,59 ± 6,12	n.b.
		120 kg N/ha	1	461,78 ± 16,53	2,40 ± 0,01
			2	518,63 ± 5,64	n.b.
	Blüte	0 kg N/ha	1	661,68 ± 5,96	0,93 ± 0,15
			2	425,48 ± 3,41	0,93 ± 0,01
		120 kg N/ha	1	516,83 ± 20,86	0,71 ± 0,02
			2	449,43 ± 14,96	1,26 ± 0,04
	Samenreife	0 kg N/ha	1	372,91 ± 2,01	0,81 ± 0,13
			2	306,88 ± 16,85	n.b.
		120 kg N/ha	1	326,63 ± 2,42	1,24 ± 0,05
			2	335,58 ± 15,44	1,10 ± 0,14

<sup>1</sup> Stickstoffdüngung, <sup>2</sup> Wiederholung, <sup>3</sup> mittlere Abweichung, <sup>4</sup> nicht bestimmbar  
 (Quercetin: Bestimmungsgrenze 4 µg/mL, Erfassungsgrenze 2 µg/mL, Nachweisgrenze 1 µg/mL; Rutin: Bestimmungsgrenze 6 µg/mL, Erfassungsgrenze 3 µg/mL, Nachweisgrenze 2 µg/mL; ermittelt mit DINTEST 2005 DE Demoversion)

### III. HPLC-ESI-MS<sup>2</sup>-Daten

Tab. 14: Massenspektrometrische Identifizierung von Rutin, Isoquercitrin und Quercetin in diversen Proben, deren Retentionszeiten zugeordnet

<b>t<sub>R</sub>, min</b>	<b>m/z</b>	<b>MS<sup>2</sup> m/z [M-H]<sup>-</sup>, [M-H]<sup>-</sup> Hauptfragmentationen</b>	<b>Struktur- zuordnung</b>	<b>Probe</b>
8,2	609	301	Quercetin-3- <i>O</i> - rhamnoglucosid	Blätter, Samen
9,1	463	301 , 300, 179, 151	Quercetin-3- <i>O</i> - glucosid	Inkubation mit zellfreien Ex- trakten aus <i>Lb. plantarum</i> K <sub>4</sub> Lb6 u. Hesperidinase
15,4	301	273, 257, 179, 151	Quercetin	Blätter, Samen, Inkubation mit zellfreien Extrakten aus <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> K <sub>4</sub> Lb6 u. Hesperidi- nase

t<sub>R</sub> Retentionszeit; m/z-Werte [M-H]<sup>-</sup> im negativen Ionisierungsmodus

## **Danksagung**

Mein Dank gilt an erster Stelle meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. K. Schwarz dafür, dass sie mir dieses Thema zur Verfügung gestellt und mich mit Anregungen und Rat unterstützt hat.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern, die mich immer unterstützt und stets an mich geglaubt haben. Ebenso gilt mein herzlicher Dank meinem Bruder, Dr. Bijan Kawiani.

Weiterhin möchte ich meinen Mitarbeitern in der Abteilung Lebensmitteltechnologie des Instituts für Humanernährung und Lebensmittelkunde an der CAU Kiel danken, insbesondere Frau Dr. Kathleen Oehlke, für das sehr freundliche Arbeitsklima. Auch danke ich an dieser Stelle meiner Bachelorstudentin Katrin Bock.

Herrn Prof. Dr. K. J. Heller danke ich für die freundliche Beratung im mikrobiologischen Bereich. Weiterhin danke ich auch den Angestellten des Instituts für Mikrobiologie des Max Rubner-Instituts in Kiel, insbesondere Herrn PD Dr. A. Geis sowie Dipl. Biol. Stephan Scholtz und Manuela Schmack nicht zuletzt dafür, dass ich dort so nett aufgenommen wurde.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Siegfried Wolffram und Herrn Prof. Dr. Gerald Rimbach für die Unterstützung und Beratung im Rahmen des EU-Projekts INTERREG III A. Herrn Dr. Ralf Loges und Dipl. Ing. agr. Mareike Goeritz aus der Abteilung Grünland und Futterbau des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der CAU Kiel für das freundliche Bereitstellen des Buchweizenmaterials danke ich auch vielmals. Stephanie thor Straten von der Forschungsgruppe Pflanzenernährung des Instituts für Pflanzenernährung und Bodenkunde der CAU Kiel danke ich für die Ermöglichung der Bereitstellung und Herrn Dr. Reiner Krämer für die anregenden Gespräche beim Bestücken der Gefriertrocknung.

Mein besonderer Dank gilt Kristina für so Vieles.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation selbständig von mir angefertigt wurde und in Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Es wurden, abgesehen von der wissenschaftlichen Beratung durch meine Betreuer, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet.

Die Arbeit wurde unter Einhaltung guter wissenschaftlicher Praxis entwickelt.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

Kiel,